



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cura da infecção por HIV: conceitos e aplicações

Trabalho submetido por
Margarida Gonçalves Esteves
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CURA DA INFECÇÃO POR HIV: CONCEITOS E APLICAÇÕES

Trabalho submetido por
Margarida Gonçalves Esteves
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professor Doutor Nuno Taveira

novembro de 2014

Agradecimentos

Acabados este cinco anos de múltiplos desafios, cujo esforço e dedicação me permitiram ultrapassar, dedico esta página aos que sempre me apoiaram e acreditaram que um dia, este dia iria chegar.

*Começo por agradecer e reconhecer o apoio demonstrado, ao **Professor Doutor Nuno Taveira** pela orientação que permitiu a realização de mais esta etapa na minha vida académica.*

*À **Prof. Doutora Carla Ascenso** e ao **Prof. Doutor Luís Oliveira** pelo apoio, profissionalismo, motivação e pela palavra amiga que sempre tiveram, incentivando-me a ver “mais longe”.*

*A todos os colegas e amigos não só por me acompanharem neste percurso, mas pela amizade que se foi construindo e sedimentando ao longo desta jornada académica, em especial **Patrícia Candeias, Ana Catarina Vaz, Pedro Quintas, João Nuno Santos, e Henrique Martins.***

*À **Inês Brito Figueiredo**, pelo apoio incondicional, por ter acreditado em mim e pelas palavras que tanta importância tiveram nestes últimos meses. Pela amizade que marcou.*

*A todas as amigas **Diana Paulo, Mafalda Boavida, Ana Miranda, Teresa Protásio** e em especial **Joana Vila Verde**, pelo carinho, disponibilidade e pela palavra amiga que estava sempre disposta a surgir.*

*À equipa da **Farmácia Parque**, pela paciência, profissionalismo e conhecimento que me passaram, marcando o meu período de estágio.*

*Ao meu namorado, **João Serrasqueiro**, pela compreensão, apoio, paciência nas alturas difíceis e motivação.*

*À minha irmã, **Beatriz** e mãe, **Maria da Conceição**, por me terem levantado nas alturas em que precisei, por nunca terem duvidado de mim, pelo amor que sempre me deram e por terem contribuído para que tudo isto fosse possível.*

*Por último e não menos importante, agradeço a duas pessoas que contribuíram para o meu crescimento enquanto pessoa e que apesar já não se encontrarem presentes, acredito que nunca me abandonarão. Ao meu pai, **António** e avó, **Conceição**.*

Resumo

Após 30 anos da identificação do HIV (*Vírus da Imunodeficiência Humana*), a cura permanece por alcançar.

Com 35 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e estimando-se que esses números continuem a aumentar, a necessidade de uma cura é algo pelo qual se deve continuar a batalhar.

Apesar dos avanços na terapêutica anti-retroviral terem diminuído a sua toxicidade e melhorado a sua tolerabilidade, esta contudo, ainda não conseguiu providenciar a erradicação completa do vírus, dado que parte deste permanece sob reservatórios celulares num estado de latência.

Todavia, uma conquista já foi conseguida por parte desta terapêutica, com a mudança do significado da infecção de mortal para crónica. Porém, a cronicidade de uma doença não é o final que se deseja atingir, caso a probabilidade da ocorrência de outras doenças do foro neurológico, cardíaco, intestinal, etc., continue a ter impacto sobre os indivíduos infectados, mesmo que submetidos a esta terapêutica anti-retroviral. Estas doenças, podem provir tanto dos efeitos tóxicos dos fármacos anti-retrovirais como da inflamação persistente e défice imunitário provocados pelo vírus.

Além disso, o acesso ao tratamento apresenta limitações, principalmente do ponto de vista económico, pelo que, nem todos os países apresentam os mesmos privilégios. Também o facto desta terapêutica ter que ser feita para o resto da vida e necessitar de uma adesão estrita, não são factores apreciáveis.

Desta forma, a cura para o HIV revela-se como o ponto chave que continua por atingir, e que quando obtido, apresentará um enorme impacto tanto no indivíduos infectado como na sociedade em geral.

Assim, esforços, estratégias e novas terapêuticas continuam a surgir, caminhando para um objectivo comum, a cura do HIV.

Palavras-Chave: HIV; Latência; Estratégias de erradicação; Cura

Abstract

After 30 years of identifying HIV (Human Immunodeficiency Virus), the cure is yet to be found.

With 35 million people infected with the disease throughout the world and the expected increase, there is a necessity to fight for the cure.

Despite the advances in the antiretroviral therapy which diminished the toxicity and improved its tolerance, there has not been a chance to exterminate completely the virus since part of it remains in a reservoir, in a latent state.

Nevertheless there have been achievements with this therapy such as the change of the meaning of the infection from deadly to chronic. However turning a disease chronic is not the goal intended to achieve, especially since other diseases such as neurologic, cardiovascular, intestinal, etc., tend to happen while the infected patients are getting treatment. Such complications can be either from the toxic effects of the antiretroviral medication taken or from the persistent inflammation and immunitary deficit caused by the virus.

Beside this, the access to the treatment has limitations, mainly in the economic point of view, since not every country has the same benefits.

Also the fact that this therapy has to be done throughout the entire patient's life in a strict way, it makes it not appealing.

In this way, the cure for HIV reveals to be a something still to be achieved, and when achieved it will have an enormous impact on the infected individual as well as on the society in general.

Therefore, with great effort, strategies and new therapies continue to appear, while moving towards a common goal, the cure of HIV.

Key-Words: HIV; Latency; Eradication strategies; Cure

Índice Geral

Índice de Figuras	9
Índice de Gráficos.....	10
Índice de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Capítulo 1 - Introdução.....	13
1. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	13
1.1. Caracterização Geral	13
1.2. Origem e diversidade do HIV	15
1.3. Estrutura e genoma.....	16
1.4. Ciclo de replicação do HIV	18
1.5. Da infecção primária ao desenvolvimento da imunodeficiência.....	20
1.6. Epidemiologia	22
Capítulo 2 - Terapêutica Anti-retroviral.....	25
2.1. Critérios para início de terapêutica anti-retroviral	26
2.2. Terapêutica anti-retroviral disponível	27
2.3. Mecanismo de acção	28
• Inibidores da Integrase (IINs)	28
• Inibidores de entrada (IEs)	28
2.4. Potência dos fármacos anti-retrovirais e resistências	29
2.4.1. Resistências aos inibidores de Protease.....	30
2.5. Novos fármacos anti-retrovirais em estudo.....	32
Capítulo 3 - Através da cura para o HIV	33
3.1. Definição de cura	33
3.2. Estaremos nós a fazer progressos?	34
3.2.1. Do passado à actualidade	34
3.2.2. A Descoberta dos controladores virais.....	34
3.3. No caminho da cura funcional – Uma abordagem geral	36
3.4. No caminho da cura real – Uma abordagem geral	36
3.5. Factores que impedem a cura	39
3.6. Métodos de medição do reservatório viral	41

Capítulo 4 – Os estudos para a cura do HIV,43	43
.....	
4.1. Estudos para a cura funcional.....	43
4.1.1. Os controladores de pós-tratamento	43
4.1.2. A criança do Mississípi	47
4.1.3. Outros casos de tratamento precoce	50
4.1.4. Um caso de tratamento em estado avançado da infecção.....	51
4.1.5. Transplante como terapêutica - Os doentes de Boston.....	52
4.1.6. Transplante em 10 doentes HIV-positivos com linfoma.....	53
4.1.7. Quais as razões que levaram a que a infecção persistisse?	53
4.2. Estudos para a cura real.....	53
4.2.1. Tratamentos baseados em transplantes de células estaminais	53
4.2.2. Terapia genética	55
4.2.3. Inibidores da histona diacetilase (HDACi)	60
4.2.4. Agonistas da Proteína Cinase C (PKC).....	68
4.2.5. A análise de vários estudos	68
4.2.6. Imunossuppressores e fármacos citostáticos	69
4.2.7. Intervenções imunoterapêuticas direccionadas para a cura.....	70
4.2.8. A citotoxicidade como estratégia	79
4.2.9. Ciclopirox e Deferiprona.....	80
4.2.10. Intensificação de terapêutica	82
4.2.11. A utilização de do Δ^9 -tetrahydrocannabinol.....	84
4.2.12. Fármacos de actuação no SNC.....	85
4.2.13. O MCPIP1	87
Capítulo 5 – O envolvimento da ética	89
Capítulo 6 - Conclusão	90
Bibliografia.....	91

Índice de Figuras

FIGURA 1: ESTRUTURA DE HIV. ADAPTADO DE (NIH, 2009)	16
FIGURA 2: CICLO DE VIDA DE HIV-1. AS PRINCIPAIS FAMÍLIAS DE ANTI-RETROVIRAIS ...	18
FIGURA 3: PREVALÊNCIA MUNDIAL DO HIV. ADAPTADO DE (WHO, 2014A)	22
FIGURA 4: NÚMERO DE PESSOAS DE RECEBEM TARV E PERCENTAGEM DE TODAS AS PESSOAS QUE VIVEM COM HIV E RECEBEM TARV NOS PAÍSES DE BAIXOS E MÉDIOS RENDIMENTOS GLOBALMENTE E POR REGIÃO DA OMS, 2013.....	26
FIGURA 5: MODELO DE FUNCIONAMENTO DO ZASC1 DURANTE A TRANSCRIÇÃO DO HIV- 1	40
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ZFN A LIGAR-SE À DUPLA CADEIA DE ADN	57
FIGURA 7: MODELO SIMPLIFICADO DE TRANSCRIÇÃO GENÉTICA	61
FIGURA 8: DIFERENÇAS ENTRE A TARV E A TERAPÊUTICA COM BNABS.....	76

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1: PROGRESSÃO DA INFECÇÃO POR VIH-1 E AS RESPECTIVAS ALTERAÇÕES NA QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4+, LINFÓCITOS T CD8+ E CARGA VIRAL.....	21
GRÁFICO 2: DELEÇÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO-1 NA CRIANÇA DO MISSISSÍPI.....	49

Índice de Tabelas

TABELA 1: ESTIMATIVA DO NÚMERO DE PESSOAS (DE TODAS AS IDADES) A VIVER COM HIV EM PORTUGAL DESDE 2001 A 2012.....	23
TABELA 2: LISTAGEM DE ANTI-RETROVIRAIS DISPONÍVEIS E LOCALIZAÇÃO GERAL DO LOCAL ONDE EXERCEM A SUA FUNÇÃO. MEDICAÇÃO ANTI-RETROVIRAL UTILIZADA EM PORTUGAL.....	27

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

cADN – ADN complementar

ANITRs – Análogos nucleósidos inibidores da transcriptase reversa

ANNITRs – Análogos não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNm – ARN mensageiro

tARN – ARN de transferência

ARVs – Anti-retrovíricos

bNAbs – *broadly Neutralizing Antibodies*

CA – Proteína da Cápside

CPX - Ciclopirox

CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*

DEP - Deferiprona

eIF5A – *inhibitors of hydroxylation of eukaryotic translation initiation factor 5A*

FCT – Emtricitabina

FDA – *Food and Drug Administration*

GALT – Tecido Linfático Associado ao Intestino

HDACi – Inibidores das Histonas Diacetilase

HLA – Proteínas de Histocompatibilidade

IEs – Inibidores de entrada

IFN- α – Interferão- α

IINs – Inibidores da integrase

IN - Integrase

IPs – Inibidores da protease

ITRs – Inibidores da transcriptase reversa

LTR – *Long Terminal Repeat*

MA – Proteína da Matriz

MCPIP1 – *Monocyte Chemotatic Protein-Induced Protein 1*

MVB – Corpos Multivesiculares

MVC – Maraviroc

NC – Proteína da Nucleocápside

NIH – National Institute of Allergy and Infectious Diseases

PCR (*Polymesare Chain Reaction*) – Reacção de Polimerização em Cadeia

qRT-PCR (*quantitative Real-Time PCR*) – Técnica de PCR em Tempo Real

PD1 – Antígeno morte Programada 1

PDL1 – Ligando morte Programada 1

RVDs – *Repeat Variable Diresidues*

SI – Sistema Imunitário

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

SU (*surface envelope glycoprotein*) – Glicoproteína exterior ou de Superfície

TALEN – *Transcription Activator-like Effectors Nucleases*

TAR – elemento de Resposta à Transactivação

TARVc – Terapêutica Anti-Retroviral Combinada

TM – Glicoproteína Transmembranar

TNF – Tenofovir

TR – Transcriptase Reversa

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

VIS – Vírus da Imunodeficiência dos Símios

WHO – *World Health Organization*

ZFN – Nucleases de dedos de Zinco

Capítulo 1 - Introdução

1. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

1.1. Caracterização Geral

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), responsável pelo síndrome da imunodeficiência adquirida, pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao género dos Lentivirus. (Pedro, 2011)

Existem dois tipos de vírus de HIV (HIV-1 e HIV-2), que dão origem no estágio final da infecção, ao Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Este estágio final, pode levar entre dois a quinze anos a desenvolver-se. (Azevedo-Pereira, 2011; WHO, 2014c)

O HIV infecta as células do sistema imunitário (SI), especialmente as células T CD4⁺, destruindo-as ou permanecendo nestas sob um estado de latência. Além disso, o vírus torna o sistema imunitário da pessoa infectada, fraco e susceptível a infecções oportunistas, causadas por exemplo, por *Mycobacterium avium* ou *Pneumocystis jirovecii*, que podem causar a morte. (Espada de Sousa & Victorino, 2011; Wei et al., 2014; WHO, 2014d)

Relativamente às vias de transmissão do vírus, têm-se as trocas de fluídos de indivíduos infectados, que podem ser de diferentes naturezas: de origem sexual, sanguínea, ou através do leite materno. Ou seja, este poderá ser transmitido por via sexual não protegida (através de troca de sémen ou secreções vaginais), existindo uma maior probabilidade de transmissão ou de risco de infecção caso o indivíduo possua alguma doença sexualmente transmissível como gonorreia, herpes, sífilis, clamídia, ou vaginose bacteriana; transfusão de sangue; transplante de tecidos; partilha de seringas ou outros objectos cortantes contaminados; e por transmissão vertical (mãe-filho durante a gravidez, parto ou amamentação). (Lafeuillade et al., 2014; WHO, 2014c, 2014d)

A transmissão do vírus tende a ocorrer principalmente nos primeiros estágios da infecção, ou seja, nos primeiros meses após o contágio, dado que os indivíduos muitas vezes não sabem que se encontram infectados e também porque a sua carga viral é muito elevada. (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

Quanto à sintomatologia envolvida, esta vai variar de acordo com o estágio da infecção. Durante a infecção primária, a sintomatologia envolvida poderá assemelhar-se a uma gripe (dores de cabeça, febre, garganta inflamada, etc.), e nos estádios mais avançados da doença já poderão começar a aparecer nódulos linfáticos inchados, perda de peso, diarreia, tuberculose, criptococose, certos linfomas, sarcoma de Kaposi, entre outros. (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

Mesmo com terapêutica anti-retroviral (TARV), a infecção põe em causa a saúde a longo-prazo, com o aparecimento precoce de doenças cardiovasculares, renais, de fígado, tumores ou até alterações neurológicas. (Hammer, 2013; Wei et al., 2014)

Desde o início da epidemia que o HIV já infectou cerca de 75 milhões de pessoas e matou cerca de 39 milhões. (UNAIDS, 2014; WHO, 2014a, 2014c)

Não existe cura para a infecção por HIV e o tratamento existente com anti-retrovirais tem que ser feito continuamente. Porém, os efeitos na diminuição da transmissão do HIV, as melhorias no sistema imunitário, a diminuição na taxa de progressão da doença e as melhorias na qualidade de vida da terapêutica anti-retroviral combinada (TARVc), permitiram diminuir a morbilidade e a mortalidade provocadas pela infecção. Em 2013, 12,9 milhões de pessoas receberam terapêutica anti-retroviral, e está descrito que apenas 36%, dos 32,6 milhões de pessoas infectadas nos países de baixos e médios rendimentos tiveram acesso ao tratamento. A situação ainda se agrava mais, quando na pediatria: menos de uma em cada quatro crianças infectadas com HIV tem tratamento, comparando com os adultos, que é um em cada três. Sendo a maior causa de morte em África e a quarta mundialmente, a formulação de uma vacina segura e eficaz é imprescindível de forma a controlar esta pandemia, principalmente nos país em desenvolvimento. (Antunes, 2011; Hope, 2013; WHO, 2014c)

A investigação para uma possível vacina contra o HIV começou no final dos anos 80, contudo, devido às diversas mutações do vírus e à sua capacidade de “fuga” ao sistema imunitário pelos diversos subtipos apresentados bem como os seus recombinantes, a formulação desta para a ligação específica ao invólucro viral foi, e continua a ser, extremamente dificultada pela variabilidade antigénica deste, e mais especificamente, pela diversidade dos epitópos relacionados com o subtipo vírico. (Pedro, 2011; WHO, n.d.-a)

Não havendo ainda vacina contra este vírus, a prevenção do mesmo continua a ser um factor fulcral e assim surgem medidas como: a contracepção; a abstinência sexual; o teste e o aconselhamento em caso de infecção por HIV ou outras doenças sexualmente transmitidas; a circuncisão masculina voluntária; os microbicidas; os anti-retrovirais como profilaxia em pré- e pós-exposição; a tentativa de redução e a educação ao nível da partilha de seringas em toxicodependentes; e a eliminação da transmissão materno-fetal de HIV, através de terapêutica anti-retroviral durante a gravidez, parto e pós-parto. (Hope, 2013; WHO, 2014c, 2014d)

1.2. Origem e diversidade do HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresenta, tal como todos os membros da família, a enzima transcriptase reversa (TR) responsável pela transcrição do ARN genómico em ADN, o qual por sua vez é integrado ao nível do genoma da célula hospedeira sob a forma de ADN proviral. (Azevedo-Pereira, 2011; NIH, 2009; Pedro, 2011)

Existem dois tipos de vírus HIV (HIV-1 e HIV-2). Estes apresentam imensas semelhanças na estrutura e morfologia, uma identidade genómica de cerca de 50% e a capacidade de gerar respostas imunitárias cruzadas. Relativamente às diferenças, estas assentam sobre o período decorrente entre a fase aguda e sintomática da doença (que no HIV-2 a fase de latência clínica pode atingir os 20 anos e no HIV-1 esta fase varia entre os 10 a 12 anos); os antigénicos moleculares; e a distribuição geográfica (HIV-2 tem maior incidência em África Ocidental e nos países que com esta contactaram através de migrações populacionais, e o HIV-1 que ostenta uma distribuição mundial). (Azevedo-Pereira, 2011; Pedro, 2011)

Tanto o HIV-1 como o HIV-2 resultam de infecções zoonóticas por transmissões víricas cruzadas entre macacos e humanos, e têm a sua origem no Vírus da Imunodeficiência dos símios (VIS) que se encontra distribuído por certas espécies de macacos, gorilas e chimpanzés. (Pedro, 2011; Taveira, Borrego, & Bártolo, 2011)

O vírus HIV-1 de acordo com a árvore genética é classificado em 4 grupos (M, N,O, P) os quais divergem entre si ao nível das sequências de aminoácidos no gene *gag* e *env*. O grupo M é o mais prevalente a nível mundial e é composto por nove subtipos – A (que apresenta quatro subsubtipos: A1-A4), B, C, D, F (com dois subsubtipos: F1-F2), G, H, J e K. Relativamente ao HIV-2, este apresenta 8 grupos (A-H), sendo que os

únicos responsáveis por epidemias são o A e o B. (Martins, 2011; Taveira & Ferreira, 2011)

Da transcrição reversa (com consequente acumulação de mutações que daí se gera) e da recombinação entre vírus infectantes numa única célula resulta a imensa diversidade intra- e inter-individual. Ou seja, a partir da combinação de diferentes tipos de vírus (grupos ou subtipos), formas de vírus recombinantes são originadas e designadas formas recombinantes circulantes (CRF) caso iniciem novos focos epidémicos. (Martins, 2011; Taveira & Ferreira, 2011)

A elevada diversidade genética do HIV, apresenta repercussões ao nível do diagnóstico, dos testes de monitorização da progressão da infecção e da eficácia da TARV (que variam em função do genótipo vírico), e nas resistências desenvolvidas aos fármacos anti-retrovirais. (Taveira & Ferreira, 2011)

1.3. Estrutura e genoma

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), exibe na sua constituição, duas moléculas de ARN (de polaridade positiva), dois genes estruturais (*gag*, *env*) e um gene funcional (*pol*) que codificam grande parte dos componentes estruturais e funcionais da partícula vírica (Figura 1). Para além destes, o HIV possui ainda seis genes regulatórios e acessórios: *tat*, *rev*, *nif*, *vpr*, *vif* e o *vpu* (no HIV-1) e o *vpx* (no HIV-2). O *tat* e o *rev* são genes regulatórios e os restantes são os genes acessórios.

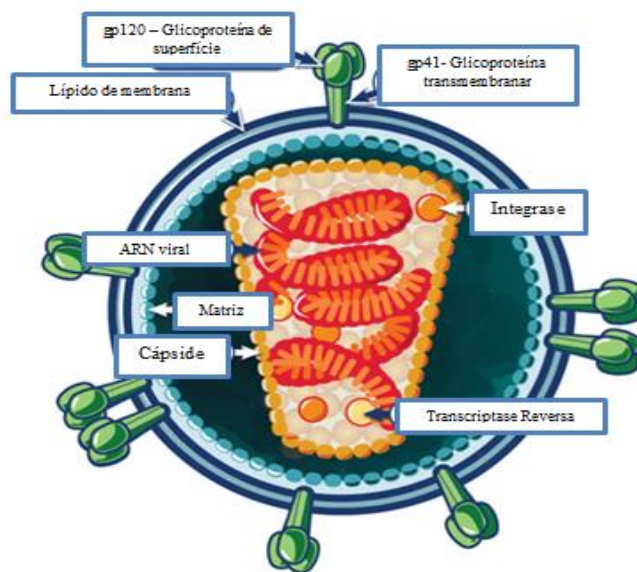


Figura 1: Estrutura de HIV. Adaptado de (NIH, 2009)

No caso do HIV-1 o gene *gag* codifica para a proteína precursora (p55) que após clivagem dá origem à proteína da cápside (CA - p24), proteínas associadas ao genoma (p6 e p9) e a proteína da matriz (MA- p17); o gene *pol* que origina uma proteína precursora (p68) que quando clivada origina enzimas como: a TR (p53), a integrase (IN- p34) e a protease (p11); e o gene *env* origina um polipéptido (gp160) precursor da glicoproteína do involucro que quando clivada origina a glicoproteína externa ou de superfície (gp120) e a glicoproteína transmembranar (TM - gp 41).(Azevedo-Pereira, 2011; Pedro, 2011; Taveira et al., 2011)

Relativamente à gp120 esta é responsável pela ligação à molécula CD4 e aos co-receptores CCR5 e CXCR4.(Taveira et al., 2011)

Analogamente, a glicoproteína TM, para a entrada do vírus na célula, sofrerá uma modificação na sua estrutura terciária, permitindo que o início da infecção se concretize. (Barré-Sinoussi, Ross, & Delfraissy, 2013; Rathbun, 2014b; Taveira et al., 2011)

Quanto aos genes acessórios, aqueles que têm implicações ao nível da síntese de proteínas acessórias cujas funções passam pela promoção de infecciosidade e replicação vírica, são no caso do HIV-1 o *vpu* e *vif* e *vpr*; e *vpx* e *vpr* para o HIV-2.(Azevedo-Pereira, 2011; NIH, 2009; Pedro, 2011)

No que respeita ao ADN provírico, as extremidades 3' e 5' apresentam as LTR (*Long Terminal Repeat*) que controlam a expressão do genoma vírico e a produção de viriões. (Azevedo-Pereira, 2011)

Relativamente à morfologia e composição do tipo de viriões produzidos em células *in vitro* tanto por HIV-1 ou por HIV-2, estes revelam uma grande semelhança. De natureza esférica e com um diâmetro de cerca de 100-110nm, estes exibem uma dupla camada de natureza lípica representante do involucro. No seu interior, com uma forma cónica invertida, apresenta-se a cápside (CA) que tem como funcionalidade a protecção e o envolvimento do ARN do genoma vírico aquando da sua inserção num novo virião durante a morfogénese. (Azevedo-Pereira, 2011; Taveira et al., 2011)

Com cerca de 1.200 moléculas de proteína CA, 80 de TR bem como certas proteínas acessórias, sabe-se também que cada virião possui ainda proteínas providas da célula hospedeira como ubiquitina, actina e ciclofilina A (esta última que se encontra especificamente ligada à proteína CA e se revela essencial no processo infeccioso do

HIV-1), proteínas de histocompatibilidade –HLA (classe I e II) inseridas no invólucro (envolvidas no processo “fuga” ao sistema imunitário) e proteínas como a ICAM-1 ou ICAM-2 bem como outras, também constituintes do invólucro, que são úteis no processo de fusão vírus-célula ou célula-célula e contribuem assim para a infecciosidade. (Azevedo-Pereira, 2011)

1.4. Ciclo de replicação do HIV

O ciclo de replicação viral tem início com a ligação da glicoproteína de superfície do HIV à proteína CD4 da membrana citoplasmática dos linfócito T auxiliares, monócitos e macrófagos (que permite a activação destas células). Dessa interacção, ocorrem posteriormente alterações conformacionais que resultam na exposição das moléculas do co-receptor das quimiocinas, CCR5 ou CXCR4 (que são os mais relevantes na infecção por HIV), e alterações conformacionais na estrutura terciária da TM, que vão permitir a fusão da partícula vírica com célula-alvo, culminando com a entrada do mesmo para o interior da célula (Figura 2). (Azevedo-Pereira, 2011; Barré-Sinoussi et al., 2013; Caldeira, 2010; Doroana, 2011c; Tan & Sattentau, 2013)

Como já foi referido, os co-receptores mais utilizados pelo HIV para entrada na célula são o CCR5 e o CXCR4. Contudo, enquanto o CCR5 é empregue na interacção com as

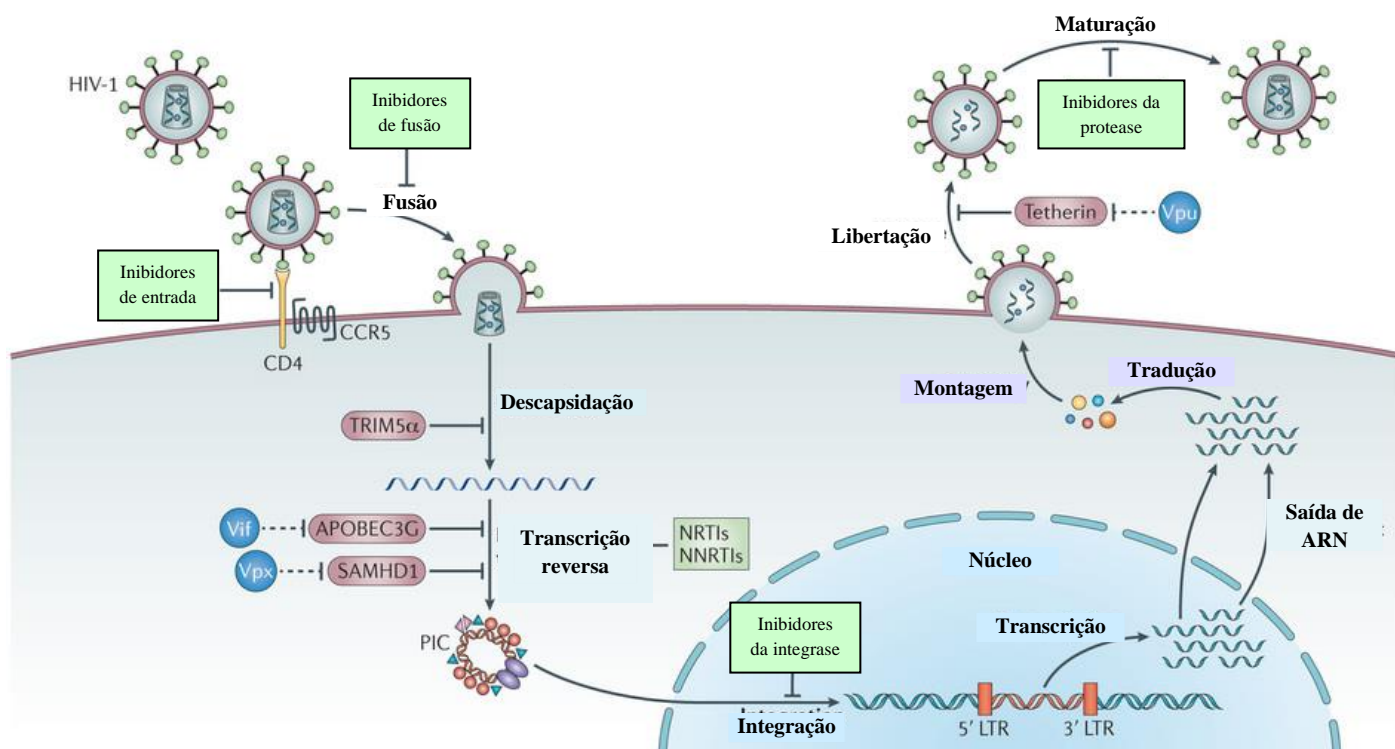


Figura 2: Ciclo de vida de HIV-1. As principais famílias de anti-retrovirais (verde) e as principais fases do ciclo onde os mesmos actuam; os factores de restrição de VIH (vermelho) e os seus correspondentes antagonistas virais (Vif, Vpx e Vpu - azul). Adaptado de (Barré-Sinoussi et al., 2013)

variantes víricas na fase inicial e assintomática da infecção (sugerindo uma maior capacidade para escapar ao sistema imunitário), o CXCR4 apresenta uma maior utilização na fase mais avançada da infecção, e por conseguinte, a sua utilização pelo vírus é representativa de uma maior depleção dos linfócitos TCD4⁺ e de um desenvolvimento mais rápido para a imunodeficiência. (Azevedo-Pereira, 2011)

Após a entrada do vírus na célula ocorre a descapsidação, com consequente libertação do complexo nucleoproteico no citoplasma. Aí, transcriptase reversa (TR) inicia a sua função ao originar o ADN complementar (cADN) a partir do *primer* ARN de transferência (tARN) que se encontra ligado ao ARN genómico na porção *primer binding site* (PBS), localizado após o final do LTR 5'. Após a síntese do cADN, forma-se o ADN provírico que é dirigido para o núcleo (onde se poderá integrar ao genoma celular). Este ADN provírico, juntamente com a IN (que permitirá a integração do genoma viral com o ADN da célula), a MA, o *Vpr*, o *Vpx* (este só no HIV-2) e a NC, formam o PIC (complexo de pré-integração), o qual é deslocado a partir de fibras de actina existentes no citoplasma até ao núcleo da célula T CD4⁺. (Azevedo-Pereira, 2011; Caldeira, 2010; Doroana, 2011c)

No núcleo, ocorre a integração do ADN provírico com o ADN celular passando a designar-se provírus. O ADN provírico é transformado em cromatina, através da interacção com as histonas. O promotor LTR do vírus, após esta integração, fica protegido pelos seus nucleossomas (*nuc-0*, *nuc-1* e *nuc-2*) dos factores de transcrição, contribuindo para a permanência do vírus num estado de latência, isto é num estado de repouso na qual a sua transcrição celular deixa de ocorrer. (Azevedo-Pereira, 2011; Ling et al., 2014; Taveira et al., 2011)

Contudo, num processo completo de replicação viral, após a integração no núcleo, ocorre a transcrição do ADN, de modo a expressar as proteínas víricas, e obtendo como resultado em 3 tipos de ARN mensageiro vírico (ARNm): ARN processado, o ARN parcialmente processado e o ARN não processado. A expressão dos genes virais é assegurada pelas proteínas reguladoras virais *Tat* e *Rev* e por factores activadores da célula hospedeira. (Azevedo-Pereira, 2011)

A síntese da proteína *Tat* deve-se aos factores de activação da célula que permitem a activação do LTR, contribuindo para a formação de alguns transcriptos completos que permitem a síntese desta proteína. Após a sua formação, esta consegue interagir com a

região TAR (*elemento de resposta à transactivação*), localizada no LTR, aumentando e favorecendo a transcrição dos ARNm virais acima descritos. (Azevedo-Pereira, 2011)

De forma a que estes ARNm sejam traduzidos, é necessária a proteína *Rev*. Esta leva os intrões dos ARNm para fora do núcleo, permitindo a consequente tradução nas proteínas provenientes dos genes *gag*, *pol* e *vpr*, *vif* e *vpx* (no HIV-2) ou *vpu* (no HIV-1). (Azevedo-Pereira, 2011)

A saída da partícula vírica passa pela interacção das poliproteínas precursoras das proteínas estruturais entre si e com o ARN genómico. Seguidamente ocorre o transporte deste complexo até aos locais de formação da partícula vírica, com múltiplas interacções com proteínas celulares. A formação do virião imaturo processa-se na região da membrana citoplasmática, onde se forma o invólucro vírico, com consequente libertação deste para a superfície celular por gemulação. No caso da formação do HIV-1 em macrófagos, estas partículas imaturas são libertadas através dos corpos multivesiculares (MVB), estruturas endossómicas envolvidas na formação e posterior libertação dos viriões imaturos. (Tan & Sattentau, 2013; Taveira et al., 2011)

A maturação dos viriões libertados dá-se pela clivagem das poliproteínas precursoras (no subcapítulo anterior referidas) através da acção da protease com formação das proteínas essenciais do vírus (também já referidas anteriormente). No caso desta clivagem não se dar, formar-se-ão viriões não infecciosos. (Azevedo-Pereira, 2011; Taveira et al., 2011)

1.5. Da infecção primária ao desenvolvimento da imunodeficiência

Logo após a infecção (cerca de 7 a 21 dias), não é possível detectar marcadores virais (anticorpos) no plasma, dado que este se encontra em replicação na sua porta de entrada e é transportando para os tecidos linfáticos, aparecendo só mais tarde no plasma. Este período de intensa replicação viral e de não detecção da infecção é denominado período janela. (Pedro, 2011)

Após uma exposição de risco e uma consequente infecção, o tempo aproximado para que se dê algum tipo de sintomatologia (síndrome gripal, exantemas, febre, etc.), que não está presente em todos os indivíduos, é de três a seis semanas. (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

Esta síndrome clínica aguda, é qualificada pela subida de virémia, (dada a contínua replicação viral) diminuição dos linfócitos T CD4⁺, com risco de aparecimento de

infecções oportunistas, caso esta queda seja muito pronunciada e subida dos linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico (gráfico 1). (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

No final da síndrome aguda, o quociente das células T CD4⁺/T CD8⁺ diminui, pois, mesmo com o aumento parcial do número de células T CD4⁺, as células T CD8⁺ aumentam para níveis iguais ou mesmo superiores aos do início da infecção (gráfico1). (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

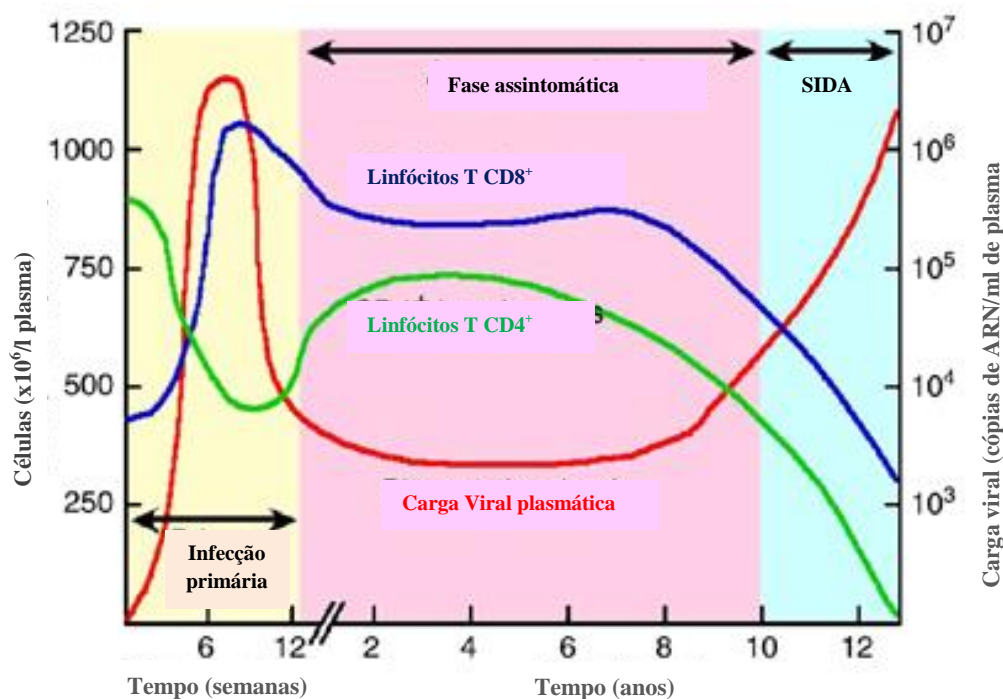


Gráfico 1: Progressão da infecção por VIH-1 e as respectivas alterações na quantificação dos linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e carga viral. Adaptado de (Munier & Kelleher, 2007)

Posteriormente à fase aguda, inicia-se a fase assintomática, que compreende um equilíbrio entre o sistema imunitário do indivíduo (a partir das respostas da imunidade humoral (anticorpos anti-p24) e celular (células T CD4 e T CD8)) e o vírus. Com isto, proporciona-se um controlo da replicação viral e por conseguinte, uma redução da viremia através da eliminação de células infectadas activas. Contudo, o SI não detecta os reservatórios víricos existentes em células T, células dendríticas e macrófagos, que se encontram em repouso (isto é, sem a ocorrência do processo transcrito que expressa as proteínas virais). Desta forma, o vírus consegue escapar ao SI e persistir no organismo, prosseguindo a infecção. (Espada de Sousa & Victorino, 2011)

A fase assintomática pode durar entre oito a dez anos (com diferenças de indivíduo para indivíduo) e caracteriza-se pela contínua replicação viral, com um possível surgimento de linfadenopatias e degradação do SI (destruição de 50 linfócitos T CD4/mm³/ano

em média, sendo que o número normal é de 800-1200 linfócitos T CD4⁺ num indivíduo saudável). Aqui a progressão da doença pode ser monitorizada pelo número de cópias de células T CD4⁺ e o número de cópias de ARN vírico, sendo também este o factor para iniciação e avaliação da terapêutica antiretroviral combinada (TARVc).(Espada de Sousa & Victorino, 2011; NIH, 2009; Valadas, 2011)

A Sida surge com um número de células T CD4⁺ igual ou inferior a 200cel/μl, aumentando o risco de infecções oportunistas derivadas por exemplo de espécies inócuas para indivíduos saudáveis como *Mycobacterium avium* ou de *Pneumocystis jirovecii*, bem como uma maior predisposição para certos tipos de linfomas provocados pelo vírus Epstein-Barr, o carcinoma do colo do útero, o sarcoma de Kaposi, entre outros.(Espada de Sousa & Victorino, 2011; NIH, 2009)

1.6. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde, desde o início da epidemia que o HIV já infectou cerca de 75 milhões de pessoas e matou cerca de 39 milhões. Em 2013, 35 milhões de pessoas estavam infectadas com o vírus e 1,5 milhões de pessoas morreram por causas relacionadas com HIV (abaixo dos 2,4 milhões de mortes que ocorreram em 2005). Apesar dos esforços para educar e prevenir a propagação deste vírus, o número de infecções diárias rondou os 6 000 em 2013, totalizando os 2,1 milhões de pessoas infectadas no mesmo ano globalmente (abaixo dos 3,4 milhões de infectados em 2001), e dessas, 70% faziam parte dos países em desenvolvimento, mais especificamente da

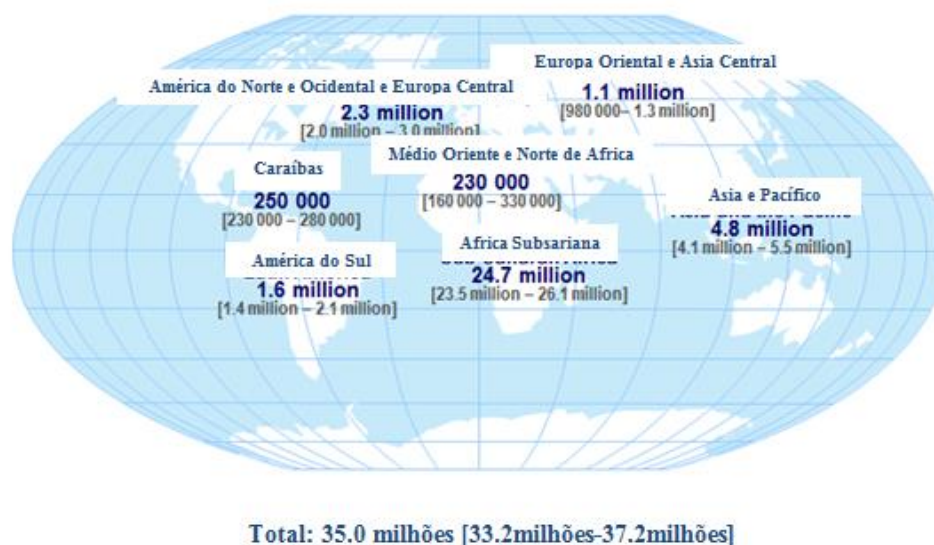


Figura 3: Prevalência Mundial do HIV. Adaptado de (WHO, 2014a)

África Subsariana (sendo esta a região mais afectada com 24,7 milhões de pessoas infectadas como se pode verificar na Figura 3). (UNAIDS, 2014; WHO, 2014a, 2014c)

Na Europa e América do Norte, o número de mortes de pessoas infectadas com o vírus diminuiu 2% entre 2005 e 2013. (WHO, n.d.-b)

- Em Portugal

Em Portugal, o primeiro caso ocorreu 1983, com um senhor que já se encontrava no estágio final da infecção, no Hospital Curry Cabral. (ROCHE, 2005)

Na actualidade, os números falam por si, e como se pode ver na tabela 1, dados recolhidos da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que o número de pessoas infectadas e a viver com o vírus aumentou desde 2001 (apesar de haver um decréscimo do número de transmissões da doença desde o ano referido até à actualidade, em cerca de 33% a nível mundial). (UNAIDS, 2013; WHO, n.d.-b)

Tabela 1: Estimativa do número de pessoas (de todas as idades) a viver com HIV em Portugal desde 2001 a 2012. Adaptado de (WHO, n.d.-b)

Número de pessoas (todas as idades) a viver com HIV			
Ano	2001	2006	2012
Portugal	[26 000-45 000]	[33 000-53 000]	[38 000-62 000]

Contudo, quando reflectimos sobre o número de notificações de Sida em Portugal, no ano passado, este aparece em terceiro lugar da União Europeia. E em 2012, 31,8% das infecções ocorridas foram identificadas como já sendo este estágio final da doença, na qual o sistema imunitário já se encontra em falência. Desta forma, os benefícios provindos da terapêutica anti-retroviral quando iniciada precocemente, já não vão ser tão marcados e existe maior probabilidade de transmissão da doença, pois os indivíduos não conhecem o seu estado patológico. (Gomes, 2013)

Com a evolução destes números ao longo dos anos e apesar da luta constante no que respeita à prevenção da infecção, a necessidade de obtenção de uma cura do HIV é um assunto grande pertinência e o qual continua a suscitar bastante interesse por parte da comunidade científica. Enquanto estudos e novas estratégias continuam para alcançar este objectivo final, há que referir a relevância dos anti-retrovirais com a diminuição da transmissão do HIV, as melhorias do sistema imunitário e a diminuição na taxa de

progressão da doença (aumentando o tempo sem manifestações clínicas da doença), com consequentes melhorias na qualidade de vida. (Caldeira, 2010; WHO regional office for Europe, 2014; WHO, 2014c)

Quando iniciada precocemente, esta terapêutica reduz a activação imunitária, diminuindo os fenómenos inflamatórios que advêm desta infecção; preserva a imunidade inata das células B e T; permite restaurar a mucosa gastrointestinal dos efeitos nefastos provocados pelo vírus; e limita a replicação viral. E para além disso, com uma grande importância, esta também limita o estabelecimento dos já falados reservatórios virais. (Douek, 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian, Ming, & Ying, 2014; Ruelas & Greene, 2013; Sáez-Cirión et al., 2013)

Por conseguinte, um diagnóstico precoce aliado a um tratamento eficaz poderão trazer inúmeros benefícios ao indivíduo infectado. (Gomes, 2013)

No entanto, num estudo realizado para verificar os efeitos da TARV quando iniciada precocemente comparativamente à iniciada durante a fase crónica da infecção, confirmou-se que início precoce de tratamento aumenta a velocidade de decréscimo das células T CD4⁺ infectadas e reduz o reservatório viral comparativamente ao tratamento tardio. Este foi submetido a 9 doentes a fazer a terapêutica na fase aguda da infecção há mais de 10 anos, relativamente a outros cuja terapêutica foi iniciada mais tardiamente mas que se mantêm com a mesma por um período também superior a 10 anos. (Buzon et al., 2014)

Todavia, é necessário referir, que a TARV mesmo quando iniciada precocemente e mantida por mais de 10 anos, não apresenta capacidade para provocar uma erradicação viral. (Buzon et al., 2014)

Com isto, uma maior profundidade nas investigações deverá ser feita, e apesar de inúmeros desenvolvimentos já se terem desenrolado no sentido de uma erradicação viral, estes ainda não foram suficientes para que a cura seja atingida. Assim, este continua a ser o objectivo por conquistar...

Capítulo 2 - Terapêutica Anti-retroviral

A terapêutica anti-retroviral teve início em 1987, seis anos após o primeiro caso de infecção reportado, com o aparecimento da zidovudina (AZT), primeiramente utilizado como anticancerígeno, e depois como análogo nucleósido inibidor da transcriptase reversa (ANITR). Inicialmente este fármaco utilizou-se em regime de monoterapia, passando posteriormente para um regime combinado com outros ANITR que surgiram, e juntando-se ainda, com um do inibidor da protease (IP) que apareceu mais tarde. (Antunes, 2011; FDA, 2014)

Os regimes em monoterapia apresentam um risco elevado de surgimento de resistência, pelo que se opta por uma terapêutica anti-retroviral combinada (TARVc), que consiste na utilização de pelo menos três fármacos anti-retrovirais de modo a suprimir a replicação do HIV, a progressão da doença proveniente do mesmo e de forma a que a carga viral no plasma se torne indetectável (<50cópias/μl). (Camacho, 2011; Goldberg, Siliciano, & Jr., 2012; WHO, UNICEF, & UNAIDS, 2013; WHO, 2014e)

Em 2013, 12,9 milhões de pessoas receberam terapêutica anti-retroviral, correspondendo a cerca de 37% do total de pessoas infectadas com o vírus e está descrito que destas, apenas 36% que corresponde a 11,7 milhões, dos 32,6 milhões de pessoas infectadas nos países de baixos e médios rendimentos tiveram acesso ao tratamento, como se pode ver na Figura 4. (UNAIDS, 2014; WHO, 2014b, 2014c)

Na pediatria, o caso muda, dado que enquanto 38% dos adultos infectados está a receber terapêutica anti-retroviral, no caso das crianças apenas 24% destas, está a receber medicamentos de suporte. Por outras palavras, menos de uma em cada quatro crianças infectadas com HIV tem acesso a tratamento, comparando com os adultos que é um em cada três. (UNAIDS, 2014; WHO, 2014c)

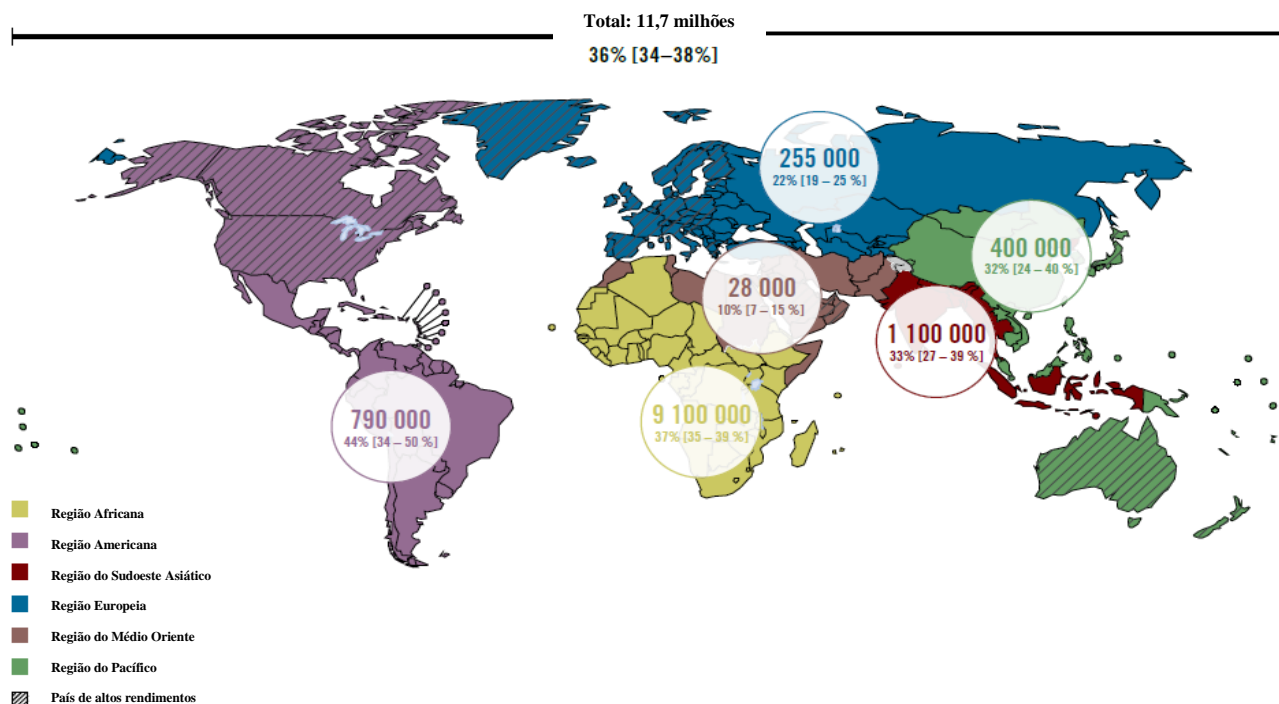


Figura 4: Número de pessoas que recebem TARV e percentagem de todas as pessoas que vivem com HIV e recebem TARV nos países de baixos e médios rendimentos globalmente e por região da OMS, 2013. Adaptado de (WHO, 2014b)

2.1. Critérios para início de terapêutica anti-retroviral

A terapêutica anti-retroviral tem em conta o risco-benefício do indivíduo infectado. Isto é, a mesma é decidida não só pela situação clínica e imunológica do doente, bem como pela toxicidade provinda dos medicamentos anti-retrovirais tanto a curto como a longo prazo, no entanto, sabe-se que quanto mais cedo iniciada, melhores resultados futuros se podem esperar (como no caso da criança do Mississípi que será abordado mais adiante). (Caldeira, 2010; Shan et al., 2012; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013; WHO, 2013)

Em 2013, as guidelines introduzidas pela OMS, implementaram então, que o início de tratamento deveria ser feito aquando do número de linfócitos T CD4⁺ fosse igual ou inferior a 500cel/mm³ de sangue em vez de 350cel/mm³ (número previsto para início de tratamento anteriormente). Sendo que seriam prioritários indivíduos em estados avançados da infecção ou cujo número de células T CD4⁺ fosse igual ou inferior a 350cel/mm³. Também se recomendou que o início de terapêutica, deveria ser iniciada logo que detectada a infecção e independentemente do número de células T CD4⁺ contadas, em indivíduos que possuíssem outras co-infecções como Tuberculose, Vírus da Hepatite B (VHB) ou outras doenças hepáticas crónicas, grávidas ou a amamentar, crianças com idades inferiores a 5 anos e casais serodiscordantes. Com a implementação

de um tratamento mais precoce, todos os aspectos benéficos desta terapêutica já acima falados serão atingidos. (Caldeira, 2010; WHO regional office for Europe, 2014; WHO, 2013)

2.2. Terapêutica anti-retroviral disponível

Os anti-retrovirais existentes (tabela 2) têm funções em quatro partes distintas do ciclo de vida do HIV, como é de possível visualização, na Figura 2 colocada anteriormente no subcapítulo do ciclo de replicação do vírus. (Caldeira, 2010; Doroana, 2011a)

Tabela 2: Listagem de anti-retrovirais disponíveis e localização geral do local onde exercem a sua função. Medicação anti-retroviral utilizada em Portugal. Adaptado de (Caldeira, 2010; Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica, 2013; Doroana, 2011a; Rathbun, 2014d)

Actuam no interior da célula	Inibidores da transcriptase reversa (ITRs)	Análogos nucleósidos (ANITRs)	Abacavir (ABC)*
			Didanosina (ddI)*
			Emtricitabina (FCT)*
			Lamivudina (3TC)*
			Estavudina (d4T)
			Tenofovir (TNF)*
			Zalcitabina (ddC)
			Zidovudina (AZT)*
		Análogos não-nucleósidos (ANNITRs)	Delavirdina
			Efavirenz (EFV)*
			Etravirina (ETV)*
			Nevirapina (NVP)*
			Rilpivirina
			Inibidores da protease (IPs)
	Atazanavir (ATV)*		
	Darunavir (DRV)*		
	Fosamprenavir (fAPV)*		
	Indinavir		
	Lopinavir (LPV)+Ritonavir (r)*		
	Nelfinavir		
	Ritonavir (r)*		
	Saquinavir (SQV)*		
	Tipranavir (TPV)*		
	Inibidores da Integrase (IINs)	Dolutegravir	
		Elvitegravir (EVG)*	
		Raltegravir (RAL)*	
Actuam fora da célula	Inibidores de entrada (IEs)	Inibidores de fusão (IFs)	Enfuvirtida (ENF)*
		Bloqueadores de co-receptor CCR5 (BCs)	Maraviroc (MVC)*
*Medicamentos utilizados em Farmácia Hospitalar, Portugal. (Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica, 2013)			

2.3. Mecanismo de acção

Abordando apenas o mecanismo de acção dos fármacos que têm alguma implicação em estratégias de cura, tem-se:

- **Inibidores da Integrase (IINs)**

Estes fármacos actuam sobre a da enzima integrase, que tem como função de transporte e integração do cADN viral ao ADN da célula hospedeira, permitindo consequentemente a formação de proteínas virais que constituirão posteriormente as partículas do vírus, a partir do processo de transcrição. Assim sendo, com a utilização dos mesmos, a enzima de integrase é inibida, por implementação de iões metálicos no local de acção da enzima, e portanto não ocorre integração, pelo que, o ciclo de replicação do vírus não é completado. (Caldeira, 2010; Rathbun, 2014c)

Não existe qualquer tipo de estrutura idêntica à integrase do HIV no organismo humano. Deste modo, este tipo de anti-retroviral actuando unicamente sobre esta enzima, apresenta muito poucas reacções adversas. Além disso, também há a referir o facto deste possuir efectividade contra estirpes multirresistentes do vírus, tendo uma actividade sinérgica com ANITRs, ANNITRs e IPs. (Doroana, 2011b; Rathbun, 2014c)

- **Inibidores de entrada (IEs)**

- **Bloqueadores de co-receptor CCR5 (BCs)**

Para que o ciclo viral se inicie é necessário uma primeira interacção da gp120 do vírus com as célula T CD4⁺, de modo a que o receptor das quimiocinas (CCR5) fique exposto, permitindo uma posteriormente alteração conformacional necessária na gp41, permitindo por conseguinte, a entrada do vírus na célula. Todavia, bloqueado este co-receptor, essa entrada do vírus fica comprometida, e portanto o ciclo viral não se realizará. (Azevedo-Pereira, 2011; Rathbun, 2014a)

O único bloqueador dos co-receptores CCR5 que está disponível no mercado é o maraviroc (MVC). Este foi formulado, com o intuito de utilização em combinação com outros anti-retrovirais existentes. A sua acção reside no bloqueio irreversível do co-receptor CCR5 existente na superfície dos linfócitos T CD4⁺, monócitos e macrófagos, impedindo assim a ligação do vírus à célula e a sua por conseguinte a sua entrada, como já acima foi referido. Este apresenta apenas acção sobre o co-receptor CCR5, não tendo

actividade sobre o co-receptor CXCR4. (Caldeira, 2010; Doroana, 2011c; Rathbun, 2014a)

2.4. Potência dos fármacos anti-retrovirais e resistências

A potência de um fármaco depende do declive da sua curva de dose-resposta. Este é representado de acordo com o aumento da inibição em função do aumento da concentração do fármaco (coeficiente de Hill). O coeficiente de Hill é uma medida da cooperatividade do ligando (fármaco) se ligar a um receptor multivalente. Uma cooperatividade positiva reflecte uma maior aptidão de um ligando adicional se ligar a um receptor, após um primeiro ligando se ligar a este. (Goldberg et al., 2012; Shen et al., 2011; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Os ANNITRs e os IPs apesar de se ligarem a alvos monovalentes, apresentam um declive da curva dose-resposta >1 , e uma cooperatividade positiva. Com um declive de 1,7 obtido na média dos estudos efectuados, mesmo em alvos enzimáticos univalentes, eles revelam desta forma a sua elevada potência quando múltiplas cópias do fármaco, se conseguem ligar num dado passo do ciclo de vida do vírus. (Goldberg et al., 2012; Shen et al., 2011; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Os regimes normalmente realizados de TARV regem-se em 2 ANITR e 1 IP, ou 2 ANITR e 1 ANNITR. Estes regimes são identificados como tendo alta capacidade anti-retroviral e baixa probabilidade de criação de resistências, pelo que, as guidelines incorporam normalmente um destes fármacos (IP ou ANNITR) na TARVc e como fármacos de regime de TARV inicial. (Rosenbloom, Hill, Rabi, Siliciano, & Nowak, 2013; Shen et al., 2011)

A resistência aos fármacos, é a maior causa de falha no tratamento. O tratamento inadequado com regimes de terapêutica supressiva e ou problemas com a adesão ao mesmo podem levar ao surgimento de estirpes resistentes.

Para alguns fármacos anti-retrovirais uma simples substituição num aminoácido no local de acção pode produzir resistência. Algumas mutações acumuladas no genoma viral, podem originar resistência cruzada a vários fármacos, diminuindo o resultado da terapêutica. (Goldberg et al., 2012; Rosenbloom et al., 2013; Sampah, Shen, Jilek, & Siliciano, 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Implícita na análise actual da resistência à TARV, está a suposição de que as mutações alteram as curvas dose-resposta para a direita, sem afectar o declive das mesmas. No entanto, no estudo de Sampah e colaboradores, verificou-se que algumas mutações podem originar modificações no declive também e consequentemente afectar a quantidade de inibição produzida pelos fármacos. (Goldberg et al., 2012; Sampah et al., 2013; Shen et al., 2011)

O IC50 é uma medida da potência anti-retroviral de um fármaco, que indica a concentração em 50% deste, necessária à inibição da replicação viral. A resistência é tipicamente expressa pela mudança no IC50, que reflecte essa mudança da curva dose-resposta para a direita como já mencionado. No entanto, já foram verificadas mutações também ao nível do declive da curva. Concentrações clínicas dos fármacos são normalmente utilizadas acima do IC50. Se uma mutação aumentar o IC50 e diminuir o declive, isso pode causar mais resistência do que somente a modificação no IC50 como anteriormente considerado. (Goldberg et al., 2012; Sampah et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

A existência da TARVc, contribuiu para a redução deste problema de aquisição de múltipla resistência. Além disso, o uso de fármacos actuando sob diferentes mecanismos contribui também para o sucesso da terapêutica de combinação. De qualquer forma estas resistências devem ser melhor estudadas de modo a que os efeitos destas mutações sobre o declive sejam também compreendidos e entrem em linha de conta aquando da verificação de resistências a certos fármacos. (Goldberg et al., 2012; Rabi et al., 2013; Sampah et al., 2013; Shen et al., 2011)

2.4.1. Resistências aos inibidores de Protease

A actividade anti-retroviral diminui drasticamente, passado o tempo de actuação, de fármacos com as curvas de dose-resposta pontiagudas e semi-vidas curtas (tais como os IPs), limitando a aptidão para a ocorrência de resistências relativa a estes fármacos. (Rosenbloom et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Uma das falhas no tratamento anti-retroviral poderia passar pela não adesão à terapêutica, no entanto, esta não é identificada como principal motivo de resistência no que toca aos IPs. Em alguns indivíduos a terapêutica com IPs falha, “sem que estes tenham desenvolvido resistências a estas drogas”. A resistência aos fármacos pode

existir já antes do início do tratamento, nas células de latência ou activas, ou, pode surgir, durante o tratamento. (Rosenbloom et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Os IPs estão entre os fármacos que apresentam maior eficácia no tratamento da infecção por HIV. Apresentando-se nas 2 de 4 terapêuticas anti-retrovirais recomendadas e também na utilização em pessoas que falham os regimes iniciais de terapêutica, estes são os únicos que mostraram sucesso, quando utilizados em regime de monoterapia. (Goldberg et al., 2012; Rabi et al., 2013)

Os inibidores da protease, inibem a clivagem das proteínas necessárias à maturação do vírus, não actuando sobre a libertação dos viriões formados, mas impedindo que estes infectem outras células. Assim, estes fármacos, acabam por actuar bloqueando a entrada do vírus (interagindo com a proteína precursora Gag não clivada e a cauda citoplasmática(CT) da proteína do invólucro viral), a transcrição reversa e os passos após transcrição reversa (impedindo a clivagem da proteína precursora Gag-Pol e portanto limitando a libertação da TR e da IN). Assim apesar da protease apesar ser o alvo nos dois casos, o substrato de inibição aqui obtido é diferente. (Rabi et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Alterações no genoma, que provoquem modificações na proteína Gag, que directa ou indirectamente, afectam o local de clivagem da protease; modificações na CT; ou mesmo em outras partes do genoma (como o gene *env*) de HIV-1, acabam por ter influência no local de ligação dos IPs, conferindo resistência a estes fármacos. Estas são ignoradas nos testes correntes de resistência aos inibidores de protease, pois não têm em linha de conta a evidência genotípica ou fenotípica resistente a estes fármacos. (Goldberg et al., 2012; Rabi et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Como os testes de resistência aos IPs apenas consideram as mutações decorrentes ao nível do gene da protease, isto permite compreender a falha destes fármacos em alguns indivíduos que supostamente não demonstram ter resistência aos mesmos, quando analisados sobre os testes usais de medição de resistência. (Rabi et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Por conseguinte, mais estudos devem ser considerados e testes mais sensíveis na resistência a estes fármacos devem ser propostos, de forma a abranger as mutações

acima descritas e a conseguir uma maior eficiência na terapêutica anti-retroviral. (Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

2.5. Novos fármacos anti-retrovirais em estudo

O dolutegravir é um fármaco que apresenta um maior efeito que todos os seus precedentes. As resistências a este fármaco são muito raras, e portanto é identificado como sendo de primeira linha de tratamento. Este fármaco pode diminuir em muito a transmissão do vírus e quiçá até contribuir para o fim da epidemia. (Lafeuillade et al., 2014)

Também no desenvolvimento de novos fármacos anti-retrovirais está o fumarato de alafenamida tenofovir (TAF). Este demonstra um decréscimo na virémia de 1 log em pouco mais de 10 dias de administração, e deverá demonstrar um perfil de toxicidade inferior ao tenofovir no que toca aos rins e ossos. (Lafeuillade et al., 2014)

A doravirina é um novo potente ANNITR que metaboliza o CYP3A4 e é activa *in vitro* contra múltiplas estirpes de HIV. (Lafeuillade et al., 2014)

A classe dos inibidores de fusão do CCR5 e CCR2 tem um composto bastante interessante, o cenicriviroc que tem também propriedades anti-inflamatórias. (Lafeuillade et al., 2014)

O BMS-663068 é um inibidor de ligação com um novo mecanismo de acção: este liga-se à gp120, sendo portanto diferente dos fármacos antagonistas do co-receptor CCR5. Este é eficaz contra muitas estirpes de HIV, mas não todas, e verificou-se potente e bem tolerado. (Lafeuillade et al., 2014)

Um estudo denominado The LATTE mostrou que a rilpivirina e GSK 1265744 na terapêutica de manutenção aquando da virémia suprimida, estão a abrir caminho para ensaios que testam formas injectáveis destes componentes combinados, que poderão ser dados uma única vez por mês. Podendo ser utilizado como uma profilaxia de pré-exposição.

Capítulo 3 - Através da cura para o HIV

3.1. Definição de cura

“Eliminação de uma doença ou condição, com tratamento médico, tornando a pessoa saudável outra vez. Resolução de um problema ou uma situação menos boa. Recuperação da saúde. Curativo, remédio. Alívio dos sintomas de uma doença ou condição”. (Medicinenet.com, 2012; Oxford Dictionaries, n.d.; Priberam Dicionário, n.d.)

Do Latim, *curare* (verbo- cuidar) e *cura* (nome- cuidado), os sentidos originais das palavras significavam “cuidado, preocupação e atenção”. Em linguagem médica esta apresenta como significado: “tratamento médico que tem como resultado curar, tornar saudável”.(Medicinenet.com, 2012)

A maioria das palavras que significavam “curar ou sarar” em línguas Europeias originalmente eram dirigidas às pessoas que estavam a ser tratadas, contudo agora também são aplicadas à doença em si: “Tempo sem a recorrência de uma doença, ou, cujo risco de uma recidiva é pequeno”. (Medicinenet.com, 2012)

Que progressos foram feitos no sentido de alcançar a cura? E quantos mais se terão que fazer? Estas são as questões que se colocam frequentemente.

A cura tem diferentes formas de ser vista e dentro destas surgem os tópicos: cura funcional e cura real.(Barré-Sinoussi et al., 2013; Lewin, Deeks, & Barré-Sinoussi, 2014; Lewin, 2014a)

A cura funcional, sendo a forma mais comum e possivelmente a mais realista de momento, consiste na colocação do vírus em remissão, ou seja, na obtenção de uma supressão viral mesmo na interrupção da terapêutica anti-retroviral, sem no entanto a erradicação completa do mesmo. (Barré-Sinoussi et al., 2013; A. Fauci, Marston, & Folkers, 2014; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a)

A cura real corresponde a forma de erradicação completa do vírus do organismo. Considera-se a mais difícil de alcançar e aquela que para a qual existe menos credibilidade de algum dia se obter.(A. Fauci et al., 2014; Katlama et al., 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a)

3.2. Estaremos nós a fazer progressos?

3.2.1. Do passado à actualidade

Desde os anos 80, em que se deram os primeiros casos de Sida, que o mundo ficou a par desta epidemia. Esta era vista como característica da homossexualidade, depois dos utilizadores de drogas injectáveis, passando para transfusões sanguíneas e finalmente para a população em geral. A comunidade científica, desempenhou então um papel fulcral, ao fazer os possíveis para verificar a origem e a causa desta doença mortal, a população com alto risco de infecção e os modos de transmissão da doença. Com isto formularam-se os métodos de prevenção da mesma. Em 1983, o vírus foi finalmente isolado, e o que se seguiu foi uma intensa pesquisa de modo a conseguir saber a interacção existente entre este e o hospedeiro, a sua patogenia e formas de o detectar, tratar e prevenir. (Barré-Sinoussi et al., 2013)

A terapêutica anti-retroviral que se seguiu (em 1986) para combater a infecção por HIV, obteve resultados significativos passados 13 anos e permitiu que a doença passasse de mortal a crónica. (Teófilo, 2013b)

Actualmente, as pessoas infectadas conseguem ter uma qualidade de vida melhorada, e com isso, um aumento da esperança de vida. Contudo, nem tudo são benefícios, apesar de haver um controlo da replicação viral, o vírus não é completamente erradicado do organismo, e portanto, esta não permite a “recuperação” completa do sistema imunitário. Além disto, o compromisso da toma diária durante toda a vida, ter custos elevados, ser ainda inacessível a uma grande quantidade de países afectados e poder vir a ter efeitos tóxicos tanto a curto como a longo prazo, fazem com que a mesma possua algumas limitações. Desta forma, a necessidade de uma cura começou já há um tempo a ser uma área de batalha. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013; A. Fauci et al., 2014; Lewin et al., 2014)

3.2.2. A Descoberta dos controladores virais

No início da pandemia, descobriram-se determinados indivíduos HIV-positivos, que conseguiam controlar a infecção (mantendo significantes níveis de células T CD4⁺), que não faziam TARV e que no entanto não desenvolviam Sida. Estes controlavam a replicação viral, e portanto, apresentavam níveis de HIV indetectáveis no plasma designando-se por conseguinte, controladores de elite. (Barré-Sinoussi et al., 2013;

Buzon et al., 2014; Chun et al., 2013; Foxall, 2013; Katlama et al., 2013; Trono et al., 2010)

Isto levou a que se pensasse que o sistema imunitário conseguiria controlar a infecção. Contudo, mais tarde verificou-se que estes indivíduos eram menos de 1% do total de infectados (0,1-0,5%), sendo vistos como indivíduos que alcançaram a cura funcional. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Foxall, 2013)

Como seria de esperar, estes “controladores virais” andaram em voga na comunidade científica que tentou reproduzir o mesmo mecanismo protector, sobre indivíduos não progressores de longo prazo, mas que não obteve resultados. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013)

Hoje em dia sabe-se que estes indivíduos apresentam uma maior quantidade de alelos HLA-B e de células T CD8⁺ que medeiam a resposta imunitária supressiva e que lhes conferem a protecção característica. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Katlama et al., 2013; Van Lint, Bouchat, & Marcello, 2013)

Apesar de se saber que os controladores de elite conseguem controlar a replicação viral, só após o estudo de Chun e colaboradores é que se conseguiu revelar a frequência que as células T CD4⁺ apresentam na replicação de HIV e/ ou na dinâmica dos reservatórios virais aquando da iniciação ou descontinuação da TARV nestes indivíduos. (Chun et al., 2013)

Neste estudo, foi demonstrado que a quantidade de células infectadas nestes controladores de elite (3 controladores, e uma pessoa infectada que serviu apenas de controlo), diminuiu significativamente, após o início de TARV (tenofovir/emtricitabina e raltegravir por um período de 9 meses), e após a paragem da mesma, a recidiva ocorreu mas o nível de carga viral manteve-se idêntico ao de antes da terapêutica. Assim foi provado, que a replicação viral continua a ocorrer nestes indivíduos, mas os níveis de vírus no plasma são indetectáveis. (Chun et al., 2013)

Todavia, mais estudos num maior número de controladores virais devem ser feitos, de modo a reforçar e a confirmar estes resultados. (Chun et al., 2013)

Apesar destas pessoas conseguirem controlar a replicação viral, os problemas de saúde a longo-prazo continuam a ser visíveis, devido à constante activação imunitária. (Foxall, 2013)

Dados recentes indicam que a replicação viral continua a ocorrer, mesmo com níveis indetectáveis de virémia (por anos ou mesmo décadas), contribuindo por conseguinte, para a activação celular e para os processos de inflamação, responsáveis pela

morbilidade e até mortalidade provinda do HIV sobre a população em geral e inclusivamente sobre estes indivíduos. (Chun et al., 2013; Foxall, 2013)

3.3. No caminho da cura funcional – Uma abordagem geral

Dados indicam que a terapêutica anti-retroviral, quando iniciada cedo (em semanas ou mesmo meses após a infecção), pode levar a uma diminuição do número de células T CD4⁺ em latência, isto é, diminuição do número de reservatórios celulares. Por outro lado, quando iniciada ainda mais cedo (em horas, ou mesmo dias após a infecção) existe a possibilidade de permitir que não hajam reservatórios e que não se estabeleça a infecção latente, conseguindo-se com isso talvez atingir a cura funcional.(Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013; Hammer, 2013)

Este foi o tão comentado acontecimento da criança do Mississípi, a qual recebeu terapêutica anti-retroviral logo 30 horas após o parto e se manteve com a mesma durante 18 meses. Posteriormente, parou a terapêutica, e a recidiva só se deu 27 meses após paragem do tratamento. (A. Fauci et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Isto indica que o vírus tem capacidade de não ser detectado na monitorização dos indivíduos afectados, quando se encontra em remissão, não sendo reveladas células infectadas pelo vírus, nem anticorpos anti-HIV no sangue. (Collins, 2014; Lewin et al., 2014)

3.4. No caminho da cura real – Uma abordagem geral

Um caso de sucesso de cura real expõe o doente de Berlim. Este, era HIV-positivo e sofreu um transplante de células estaminais (dado possuir leucemia), de um dador contendo a mutação $\Delta 32$ para o co-receptor CCR5. A mutação CCR5 $\Delta 32$, confere resistência ao vírus devido à deleção no gene do co-receptor CCR5, impedindo por sua vez, a entrada do HIV com tropismo para este co-receptor nas células T CD4⁺. (Hammer, 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

No resultado deste transplante, o doente demonstrou não possuir virémia mesmo na ausência de TARV há mais de 5 anos, definindo-o como aparentemente curado. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

No caso dos dois indivíduos de Boston, HIV-positivos, estes também sofreram um transplante de células estaminais hematopoiéticas allogenicas, devido a um linfoma,

mas provenientes de doadores que tinham as células normais do co-receptor CCR5. Mesmo com o transplante e células susceptíveis à infecção, a evidência de HIV após monitorização, foi nula enquanto eles faziam TARV. Contudo, quando a pararam, sofreram uma recidiva. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Katlama et al., 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a)

Com isto, um aspecto importante a retirar, é o de que a TARV feita antes do transplante, provavelmente preveniu, nestes indivíduos, a ocorrência imediata da infecção. (Katlama et al., 2013; Lewin et al., 2014)

Contudo, neste caso, apesar de se tratar da realização de um transplante como no doente de Berlim, as células utilizadas não possuíam a mutação $\Delta 32$ para o co-receptor CCR5, e por conseguinte, a tentativa de cura aqui abordada seria de cura funcional e não de cura real, contrariamente ao doente de Berlim. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Katlama et al., 2013)

Com isto, uma das formas de se combater estas recidivas de HIV, poderá passar por manter ou aumentar a imunidade específica contra HIV, controlando esta pequena quantidade de vírus indetectável. (Lewin et al., 2014)

Com o conhecimento aumentado acerca da existência dos reservatórios virais e do seu mecanismo de "persistência", novos caminhos foram abertos na eliminação do vírus destas células latentes. (Barré-Sinoussi et al., 2013)

A descoberta de que os inibidores da histona diacetilase (vorinostat, romidepsine), conseguem reactivar a transcrição do HIV nas células de memória, resultando em níveis elevados de ARN não excisado e na não diminuição do ADN viral, permitiu verificar que a latência é reversível. Porém, mais pesquisa deve ser feita no sentido de determinar se estes inibidores apresentam benefícios na eliminação dos vírus latentes. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Porém agora surgem outras questões: serão esses inibidores capazes de activar uma quantidade suficiente de reservatórios celulares? E essas mesmas células conseguirão ser destruídas depois de activadas?(CATIE, 2013)

A eliminação do HIV, terá que ter muito provavelmente uma dupla abordagem: a activação viral e a sua eliminação. A denominada “*shock and kill*”, através do choque, isto é, da activação da expressão viral, a sua subsequente morte poderá dar-se através de

várias estratégias que serão abordadas mais à frente. (Lewin et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Na imunoterapia de estimulação, novas descobertas apontam a estimulação do sistema imunitário, particularmente as células T CD8⁺, de forma a que estas reconheçam e ataquem as células infectadas por HIV. A conjugação destas descobertas com a abordagem anterior das terapêuticas utilizadas para activar os reservatórios celulares, resultaria numa perfeita combinação, e este poderá ser o próximo passo para terapêuticas futuras. (CATIE, 2013)

Um sucesso alcançado também ultimamente, foi a modificação genética ao nível das células tornando-as resistentes ao HIV, através da eliminação do co-receptor CCR5. (Lewin et al., 2014)

Um outro caso de actuação a nível de cura real, são os anticorpos monoclonais que mostraram ter influencia sobre a entrada do vírus (proveniente das células de latência), em novas células T CD4⁺ de indivíduos cuja virémia se encontrava controlada pela TARV. Também a replicação do HIV nas células T CD4⁺ destes indivíduos foi profundamente reprimida por estes anticorpos monoclonais específicos para o HIV. (Chun et al., 2014)

Para além disso, conseguiu-se igualmente verificar que estes anticorpos têm a capacidade de atrasar ou prevenir recidivas após a interrupção da terapêutica anti-retroviral em animais infectados, e bloquear a transmissão da infecção célula-a-célula *in vitro*. (Chun et al., 2014; Ko et al., 2014)

Estas descobertas, têm implicações na imunoterapia passiva dando esperança no controlo das recidivas em doentes cuja TARV se pensa interromper. (Chun et al., 2014)

Sendo esta funcional ou real, a inclusão do tratamento imunitário, vacinas, terapêutica genética, transplantes medulares, ou mesmo a abordagem a outras ciências como oncologia para obtenção de novas ideias e consequentes conhecimentos, são projectos e conjugações de ciências, que podem prometer vir a ser vindouros.

As tentativas dos investigadores em eliminar o reservatório viral continua a ser a arma que se deseja atingir para a erradicação do vírus do organismo. (A. S. Fauci, 2014; Sáez-Cirión et al., 2013)

A palavra cura, na ausência de uma completa erradicação viral, pode não ter o uso mais apropriado para uns, e é por muitos pensada como também não sendo possível.

Contudo, o contínuo pensamento que uma possível investigação poderá originar a cura, mesmo sendo esta “apenas” funcional, vai continuar a ser a esperança e talvez daqui a umas décadas a ideia passe à prática e esta se concretize...

3.5. Factores que impedem a cura

O facto da terapêutica anti-retroviral apenas actuar sobre os vírus em replicação nas células activas e não ter efeito sobre os reservatórios celulares em latência impede a destruição destes últimos e portanto, a erradicação completa do vírus do organismo, como já antes foi referido. (Qu, Wang, Ding, Wang, & Zhang, 2014)

Dos factores que mantêm o estado de latência celular e regulam a replicação viral, e especificamente a transcrição do HIV, contam-se: a organização da cromatina, a funcionalidade de alguns factores celulares, as modificações epigenéticas, o transactivador Tat e os seus cofactores celulares. Todavia, também a nível não transcripcional esta latência é garantida. Na pós-transcrição, a utilização dos microARNs contribui para a inibição da tradução do vírus, e por sua vez, para a manutenção deste estado de latência viral. (Bruce et al., 2013; Ho et al., 2013; Taveira, 2013; Trono et al., 2010)

A região LTR do genoma viral, que serve de promotor viral é um local bastante importante de ligação dos factores de transcrição provenientes da célula hospedeira : como o factor nuclear κ que aumenta a actividade das células B (NF- κ B); o factor nuclear de activação das células T, presente no núcleo das células T CD4⁺ e também o factor (ZASC1) que contribui para a elongação da transcrição e o qual, pode ser inibido. (Bruce et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

A transcrição do HIV é regulada pela proteína viral Tat, cuja ausência pode originar o início de uma transcrição eficiente, mas apenas um pequeno número de ARNs transcritos de comprimento total a partir do promotor LTR do HIV-1. Isto deve-se à paragem da polimerase II na ausência desta proteína. Este bloqueio é ultrapassado pela Tat através do recrutamento do P-TEFb até à região de resposta à transactivação (TAR) (Figura 5).(Bruce et al., 2013)

Quanto ao factor de transcrição ZASC1, este liga-se a elementos específicos de ADN viral no LTR e regula a transcrição pró-viral de HIV a partir da estimulação da

actividade da Tat. Da co-operação realizada entre a Tat e o ZASC1 resulta a posterior elongação transcripcional. Análises verificaram que este factor recruta a Tat e o P-TEFb para o promotor de HIV na região TAR (Figura 5). Assim, este ZASC1 é visto como um novo regulador da expressão dos genes de HIV-1. (Bruce et al., 2013)

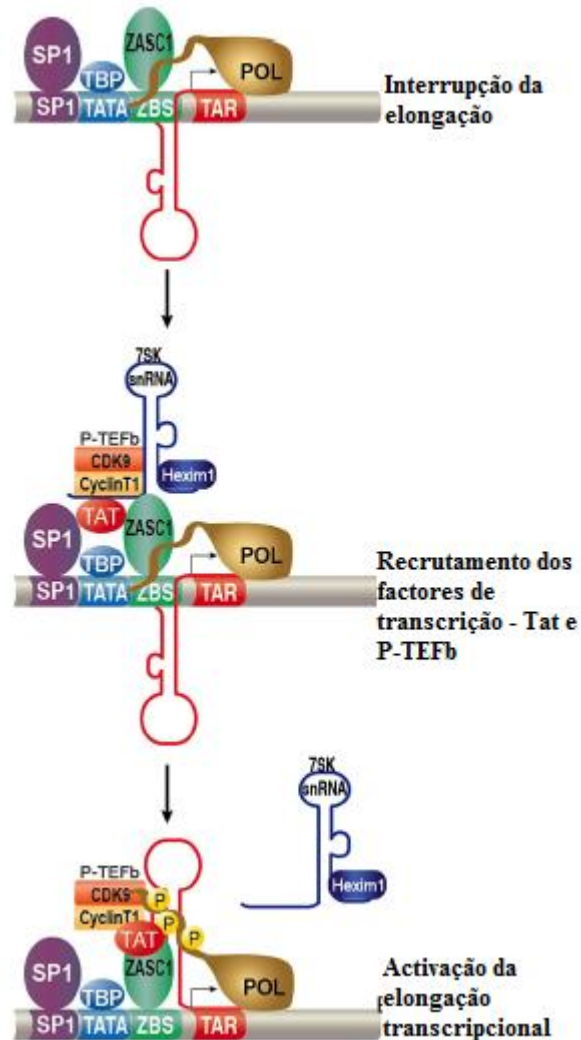


Figura 5: Modelo de funcionamento do ZASC1 durante a transcrição do HIV-1. Primeiro: a transcrição é interrompida pela paragem da polimerase II na ausência da Tat. Segundo: o factor ZASC1 recruta o P-TEFb (que está inibido pelo factor 7SK snARN) e a Tat até à região TAR. Terceiro: ocorre uma modificação conformacional quando o P-TEFb é libertado do seu inibidor a partir da co-operação entre a Tat e a TAR. Posteriormente, tanto a Tat como o P-TEFb permitirão a fosforilação da POL II, a partir da TAR, com consequente activação da elongação transcripcional. Adaptado de (Bruce et al., 2013)

Compreender o papel dos factores de transcrição celulares durante a infecção produtiva ou o estado de latência, poderá ajudar na busca de novas terapêuticas de inibição da reactivação ou estimulação da mesma para a erradicação posterior das células infectadas com a ajuda da TARV. (Bruce et al., 2013)

3.6. Métodos de medição do reservatório viral

Os estudos *ex vivo*, quando realizados criteriosamente, são métodos robustos, reprodutíveis e sensíveis para testar a eficiência de fármacos nas células de latência.

Um outro modelo para testar as estratégias de erradicação viral baseia-se na utilização de animais: como os ratos humanizados ou macacos. Uma vantagem da utilização de modelos animais é a capacidade de retirar amostras mais extensas de tecidos, conseguindo aceder aos vírus residuais, e conseguir-se analisar o efeito de estratégias de tratamento combinadas em outros compartimentos que não somente o sangue. Também na utilização de fármacos de forma mais extrema (com dosagens maiores ou durante um maior tempo) para erradicar o vírus do hospedeiro, podem ser aplicadas em animais, tentando experimentar estratégias de "cura" e avaliações de risco-benefício que podem impedir o uso a longo prazo em humanos. (Garrido & Margolis, 2014; Laird et al., 2013; Ling et al., 2014)

Na proliferação das células T CD4⁺ que se encontram num estado de latência, a cópia do HIV integrado nas mesmas também passará para outras células, pelo que, consequentemente, o reservatório também sofrerá um aumento. Num estudo verificou-se que mais de metade do ADN de HIV em reservatório detectado, é derivado da proliferação realizada de uma única célula de latência T CD4⁺. (Jefferys, Voronin, Dumiak, & McEnery, 2014)

Ya-Chi Ho e colaboradores, identificaram provírus não provenientes de replicação competente indicando que o tamanho do reservatório pode ser até 60 vezes maior do que o anteriormente estipulado. (Ho et al., 2013; Qian et al., 2014)

Uma das maiores dificuldades na obtenção da cura para o HIV resulta da medição dos reservatórios virais, dado que os testes actuais são caros, requerem uma grande quantidade de sangue e não conseguem convenientemente medir o reservatório. (Cohen, 2014; Eriksson et al., 2013; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Um dos testes, designado *quantitative viral outgrowth assay* (QVOA), implica a cultura de sangue de um indivíduo infectado e células não infectadas de forma a medir a produção viral de novos viriões. Este é um teste caro, necessita de muito tempo de execução e requiere grandes quantidades de sangue (>100ml). Além disso, os valores obtidos neste teste são subestimados, visto que o ensaio menospreza parte do ADN pró-viral, dos provírus (aptos a produzir vírus competentes) que permanecem não induzidos

após um estímulo máximo e único de activação. (Cohen, 2014; Garrido & Margolis, 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

Num outro teste realizado pelo método de PCR (*polymerase chain reaction*) para detectar o material genético de HIV, os valores obtidos são sobrestimados (pelo menos 2log mais altos que o método anterior), dado que este mede inclusivamente ADN mutado, isto é, o ADN não viável. (Cohen, 2014; Eriksson et al., 2013; Ho et al., 2013; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

No entanto, o problema implícito em ambos os ensaios não é a sensibilidade, pois tanto o QVOA como o PCR conseguem identificar uma única célula de latência. O problema reside sim no tamanho da amostra de tecido analisada. Mesmo grandes vasos ou amostras de tecido, podem não ter células infectadas, mas elas podem persistir noutras partes do corpo do doente. (J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

A subestimação obtida pelo método QVOA, pode ter em conta o atraso nas recidivas indicando uma aparente, e a sobre estimação do reservatório de latência pela detecção dos pró-vírus defectivos pelo método de PCR poderá resultar numa exposição excessiva e prolongada aos agentes tóxicos de reversão de latência. (Ho et al., 2013)

Desta forma, a formulação de um ensaio capaz de medir com precisão estes reservatórios, torna-se imprescindível de forma a que se consiga avançar para uma cura. (Eriksson et al., 2013)

Um novo teste denominado TILDA (*Tat/Rev induced limiting Dilution Assay*) foi apresentado por Chomont e colaboradores, e provou conseguir medir quantidades significativamente pequenas de vírus, relativamente aos outros anteriores. Para além de ser mais barato e requerer unicamente 10 µl de sangue, este teste também utiliza o método de PCR, contudo, neste caso, ocorre o seleccionamento de partes específicas do ADN necessárias para a replicação, e as quais normalmente estão ausentes no ADN que codifica para vírus não competentes. (Cohen, 2014; Collins, 2014)

A descoberta de um biomarcador capaz de identificar a quantidade de HIV que se encontra em replicação mesmo quando em remissão, seria uma mais valia, pois permitiria de prever se, e quando, o indivíduo iria sofrer alguma recidiva após a suspensão da TARV. (Lewin et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Capítulo 4 – Os estudos para a cura do HIV, Onde estamos e para onde vamos

4.1. Estudos para a cura funcional

A cura funcional, como já anteriormente foi dito, consiste no controlo da replicação de HIV a longo-prazo, sem que haja utilização de TARV. Ou seja, corresponde à remissão do vírus sem que este desapareça por completo do organismo, mas que no entanto consiga ser controlado sem a ajuda de terapêutica. (A. Fauci et al., 2014; Lewin, 2014a)

A maior barreira na cura do HIV consiste em compreender a natureza dos reservatórios virais. (Teófilo, 2013b)

4.1.1. Os controladores de pós-tratamento

A limitação dos reservatórios virais tanto nos controladores de elite (já anteriormente falados) como nos controladores pós-tratamento (a seguir mencionados), parece ser o factor chave para o controlo da replicação viral, após a interrupção da terapêutica. Nos últimos, esta redução dos reservatórios virais e consequente controlo parece ser devido ao início atempado da terapêutica e ao período de tratamento prolongado, como se poderá observar nos estudos que se seguem. Assim, a designação dada a estes indivíduos é controladores de pós-tratamento. (Sáez-Cirión et al., 2013)

4.1.1.1. O mistério do estudo Visconti

Este coorte, realizado em França, foi submetido a 14 pessoas, HIV-positivas, que iniciaram a terapêutica anti-retroviral no estágio inicial da infecção (em média 10 semanas após o início da infecção), entre 1996 e 2002. (CATIE, 2013; A. Fauci et al., 2014; Qian et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2013)

Este estudo investigou se as características destes 14 controladores de pós-tratamento eram similares às dos controladores de elite (indivíduos que conseguem controlar espontaneamente a replicação viral). (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Numa média de 3 anos de TARV iniciada durante a fase aguda da infecção, esta foi interrompida e os indivíduos apresentaram uma carga viral muito baixa (cerca de 400 cópias/ml de sangue), não tendo que recomeçar o tratamento. O controlo da infecção foi observado por um período de 7,5 anos após a paragem na terapêutica, e há que referir que estes indivíduos não apresentavam as mesmas características genéticas que dos

controladores virais de elite. (Collins, 2014; Lewin, 2014a; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014)

A TARV que inicialmente foi utilizada constava de dois ANITRs e um IP. A carga viral que em média apresentavam antes do tratamento era 1000 000 cópias/ml de sangue e o número de células T CD4⁺ era cerca de 500 células/mm³ (números bastante diferentes dos controladores de elite que apresentam níveis reduzidos de carga viral e altos de células T CD4⁺). (CATIE, 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Após o começo da terapêutica, o nível de carga viral baixou significativamente para menos de 50 cópias/ml de sangue e as células T CD4⁺ aumentaram para 900 células/mm³. (CATIE, 2013)

Quando se deu a paragem da TARV, os resultados mantiveram-se idênticos ao do início da mesma, apesar da carga viral ter subido um pouco, mas nunca passou das 400 cópias/ml de sangue (como já acima foi referido) e o número de células T CD4⁺ rondaram sempre as 441 a 1600 células/mm³. (CATIE, 2013)

Testes de laboratório indicaram que estes indivíduos não possuíam qualquer modificação genética que permitisse o controlo do HIV (contrariamente aos controladores de elite que apresentam níveis elevados de HLA B conferindo-lhes protecção), e inversamente, alguns até possuíam genes associados ao rápido desenvolvimento da infecção para Sida. (CATIE, 2013; Katlama et al., 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Sáez-Cirión et al., 2013; Van Lint et al., 2013)

Existem células do SI capazes de controlar a infecção, as células T CD8⁺. Contudo, o número destas células nestes indivíduos não era muito grande e portanto a sua capacidade para combater a infecção seria também pequena. (CATIE, 2013; Katlama et al., 2013; Sáez-Cirión et al., 2013)

Dados que ainda se obtinham de alguns doentes, era que o número já baixo de reservatório viral se manteve idêntico após a interrupção do tratamento e, em alguns, esse número chegou mesmo a diminuir. (CATIE, 2013; Sáez-Cirión et al., 2013)

Apesar de interessante, este estudo pode não ter o mesmo resultado para todas as pessoas infectadas por HIV com tratamento antecipado. E, há que referir que neste estudo nenhuma pessoa ficou curada, mas muitos conseguiram manter a carga viral baixa não tendo que retomar a TARV, independentemente do background genético não muito favorável. Todavia, os investigadores franceses que procederam a este estudo indicaram que uma TARV quando iniciada precocemente, isto é, o mais cedo possível após a infecção, poderá levar a uma cura funcional em cerca de 10% dos indivíduos.

(CATIE, 2013; Collins, 2014; Lewin, 2014a; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014; Sáez-Cirión et al., 2013)

De facto, apesar de muito importante, este estudo coloca imensas questões, e o mecanismo aqui subjacente continua um mistério. Contudo, os investigadores franceses continuam a querer descobri-lo para poder formar bases para novas investigações e ensaios clínicos. (CATIE, 2013)

4.1.1.2. O estudo Cascade

O caso Visconti, não foi o único a encontrar pessoas que após a interrupção da terapêutica conseguiam manter a sua carga viral em níveis baixos. Um outro estudo observacional com 24 coortes, denominado Cascade levado a cabo na Europa-Canadá-Austrália, também verificou casos raros de controlo virológico por mais de 2 anos após interrupção da terapêutica anti-retroviral. Das 25 629 pessoas HIV-positivas e infectadas entre 1996 e 2009 (existentes numa base de dados dos investigadores deste estudo), eles descobriram que 259 indivíduos começaram o tratamento 3 meses após a infecção, interrompendo o tratamento passado 1 ano. Posteriormente, foi verificado que 11 dessas 259 pessoas, ou seja 4%, conseguiram manter os níveis de carga viral < 50 cópias/ml de sangue passados 2 anos de interromperem a TARV. (CATIE, 2013; Madec et al., 2013)

Para se designarem controladores virais os indivíduos tinham que apresentar pelo menos 5 valores de carga viral consecutivos inferiores a 400-500 cópias/ml e o fim do controlo viral seria identificado quando dois valores consecutivos de carga viral se apresentavam superiores a 2000 cópias/ml. Foi verificado também que o controlo viral se pode dar mesmo com níveis de células T CD4⁺ < 500 células/mm³. (Madec et al., 2013)

Logo após se dar a seroconversão, estes controladores virais obtiveram níveis de células T CD4⁺ de 749 células/mm³ e 58% já apresentava carga viral indetectável. (Madec et al., 2013)

No entanto, alcançar o controlo de HIV, não é um sistema automático e pode demorar anos mesmo após a seroconversão. (Madec et al., 2013)

Vários ensaios clínicos, já demonstraram que a interrupção da TARV quando iniciada num estado avançado da infecção, pode levar a um grande risco de doença e até mesmo à morte. Contudo, quando iniciada no princípio da infecção, a TARV pode ser interrompida, e o níveis virais controlados num pequeno grupo de pessoas. Contudo, os

cientistas ainda não descobriram quais os factores genéticos ou outros que poderão ajudar ao controlo desta infecção em certos pacientes quando o tratamento é iniciado cedo. (CATIE, 2013)

Reflectindo sobre os alelos protectores HLA B, o número e as respostas aumentadas dos linfócitos T CD8⁺, os factores de restrição do HIV que impedem a sua replicação nas células T CD4⁺ (estando envolvidos nos fenómenos de latência viral), são tudo factores que podem promover a um controlo viral, no entanto, outros factores genéticos e imunitários também devem estar presentes. (Madec et al., 2013)

Adicionalmente, estudos mais extensos envolvendo dados de vários doentes são necessários para ajudar verificar a existência destes raros indivíduos e a compreender a resistência destes doentes ao HIV e à compreensão do funcionamento do seu sistema imunitário, de forma a que mais ensaios clínicos consigam replicar estes acontecimentos. (CATIE, 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a)

4.1.1.3. O tratamento com TARV em controladores virais

Os controladores virais, apesar de manterem baixos níveis de virémia no plasma, continuam a ter uma elevada activação imunitária, elevados níveis de translocação microbiana, (devido a alterações e à destruição do GALT (tecido linfático associado ao intestino)) comparativamente aos indivíduos HIV negativos e às pessoas HIV-positivas com virémia suprimida a fazer TARV. Estes também apresentam níveis mensuráveis de ARN e ADN viral no intestino. (Hatano et al., 2013)

Uma minoria (7-10%) dos controladores, têm grandes níveis de activação das células T progredindo imunologicamente para Sida independentemente do controlo virológico; estes apresentam ainda elevadas medidas de aterosclerose comparativamente aos indivíduos HIV-negativos. (Hatano et al., 2013)

Num estudo coorte com 16 controladores virais que foram submetidos a TARV por 24 semanas, para avaliar os efeitos imunológicos e virológicos do tratamentos nestes indivíduos. Observou-se por métodos ultra-sensíveis que a TARV diminui o ARN viral tanto no plasma, intestino bem como no tecido rectal. (Hatano et al., 2013)

Os biomarcadores (IL-6, sCD14 e o dímero-D), que se mantêm elevados nas pessoas não tratadas ou em tratamento não controladoras, são preditivos da morbilidade e mortalidade característica da infecção. Estes decaíram ao nível do sangue e mucosa intestinal com a TARV nestes indivíduos também. Situações similares foram também

obtidas com os controladores de elite com TARV prévia . Isto confirma que a replicação viral nos controladores continua a ocorrer e contribui para um estado de inflamação crónico correspondente. (Hatano et al., 2013)

Quanto às limitações deste estudo, impõe-se na amostra reduzida e no curto tempo em que o estudo foi realizado, devendo fazerem-se mais e maiores estudos, com uma maior duração. (Hatano et al., 2013)

Poderia pensar-se que com o início da TARV nestes indivíduos, quando a mesma fosse descontinuada, poderiam observar-se diminuições no controlo virológico levando a uma recidiva, contudo, em indivíduos que decidiram interromper a TARV neste estudo, não se verificaram recidivas. Apesar de 24 semanas de TARV ter baixado os níveis de activação das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, esta não regularizou estes parâmetros como os observados nos indivíduos HIV-negativos. No entanto, não obstante, há que referir que a TARV demonstrou benefícios visíveis e foi bem tolerada. (Hatano et al., 2013)

Isto muda o conceito de cura funcional. Que se por um lado esta não tem em conta o bloqueio completo da replicação viral, tentando apenas a que a mesma infecção possa ser controlada; por outro lado, o controlo virológico a longo-prazo parece ser difícil de alcançar. (Hatano et al., 2013)

Os controladores virais, não podem representar o melhor modelo de cura funcional, se considerarmos a cura como um estado livre de doença e não apenas a não necessidade de tratamento. (Hatano et al., 2013)

4.1.2. A criança do Mississípi

Este caso foi revelado de grande importância por parte da comunidade científica e levou ao levantamento de diversas questões. (CATIE, 2013)

A equipa de investigação relatou entrada de uma mulher em trabalho de parto e a qual não era seguida durante a gravidez pelo que, os médicos só souberam que ela era HIV-positiva nesse momento com a utilização de um teste rápido de despiste HIV. Nessa altura, verificaram que a carga viral dela era de 2432 cópias/ml de sangue e os seus níveis de células T CD4⁺ eram de 664 células/mm³ e não havia qualquer existência de TARV tomada. Após o nascimento da criança, verificaram que esta possuía ADN viral nas células polimorfonucleares e ARN viral (com carga viral de 19812 cópias/ml de

sangue), confirmando a infecção pelo vírus ainda no útero, pois caso fosse durante o parto, esta indicaria uma carga viral indetectável quando realizados os testes de detecção (feitos logo após o parto). Com isto, iniciaram imediatamente a TARV (com três fármacos: nevirapina, zidovudina e lamivudina, de modo a evitar a formação de estirpes resistentes), 30 horas após o nascimento, como se pode ver em (A) no gráfico 2. Passada uma semana a nevirapina foi substituída pelo kaletra (lopinavir+ ritonavir), de modo a evitar o aparecimento de resistências, no caso de não adesão à terapêutica (A - gráfico 2). No mês que se seguiu a sua carga viral já era de 48 cópias/ml de sangue. (CATIE, 2013; A. Fauci et al., 2014; Persaud et al., 2013; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

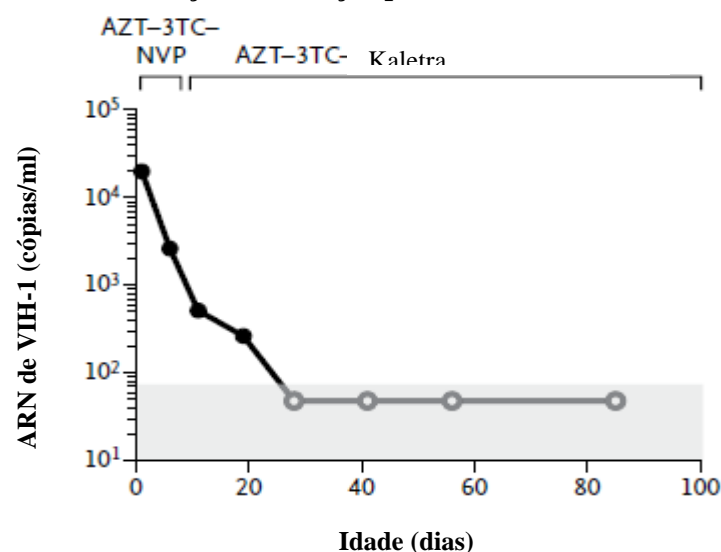
Por razões desconhecidas a família deixou de visitar o hospital passados 18 meses e a criança deixou de fazer terapêutica, como se pode verificar em (B) no gráfico 2. Ao final de 2 anos a família reaparece e quando fazem testes genéticos, imunológicos e virológicos, para se ter a certeza que a criança era a mesma, e caracterizar a persistência da infecção por HIV-1, verificaram que a carga viral da criança era de apenas de 1 cópia/ml de sangue. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Persaud et al., 2013)

Sabe-se actualmente que houve uma recidiva, mas a mesma só ocorreu passados 27 meses, pelo que, o tempo que demorou para o aparecimento desta só por si já é um marco. (A. Fauci et al., 2014; Lewin et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Tanto neste como nos outros casos abordados, o tratamento precoce com TARV e a duração da mesma são considerados a chave que pode permitir um controlo viral com a diminuição do número de reservatórios virais ainda que, com a ocorrência de recidivas. (Collins, 2014; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014b; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Assim sendo, mais estudos são necessários para que este caso se replique (alargando o intervalo ou mesmo eliminando o surgimento de recidivas) em mais acontecimentos de transmissão vertical, e posteriormente se abranja a uma maior escala relativa a situações de início de infecção. (Lewin, 2014a)

A Confirmação da infecção por VIH-1



B Controle da replicação de VIH-1

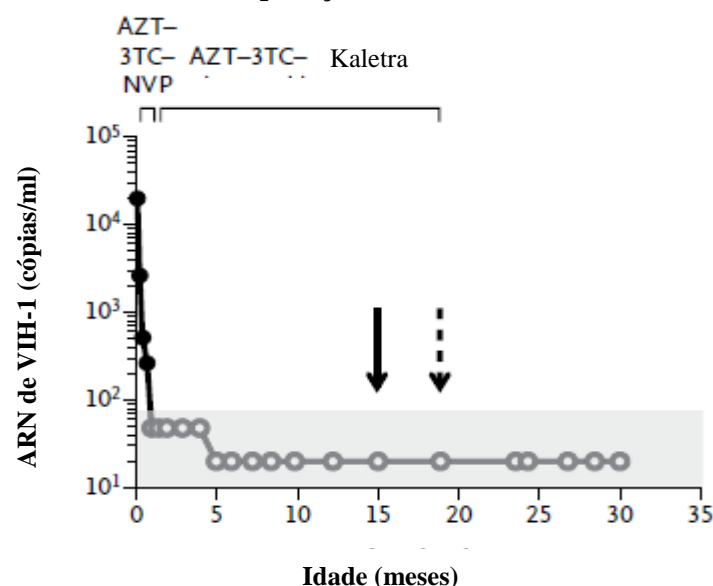


Gráfico 2: Deleção do vírus da imunodeficiência humana tipo-1 na criança do Mississípi. Adaptado de (Persaud et al., 2013)

A: Níveis de ARN viral, confirmando a infecção por VIH-1, com valores indicativos da mesma nos primeiros 4 pontos do gráfico e após se iniciar TARV. Também se verifica o declínio da infecção característico do início da TARV.

B: Níveis de ARN viral, indicando o controlo da infecção, durante a TARV e após a descontinuação da mesma. A seta preenchida indica os dados provenientes da farmácia, da última vez em que as prescrições de TARV foram preenchidas (até aos 15 meses de idade da criança). A seta a tracejado, indica a altura, referida pela mãe da criança, em que a TARV foi descontinuada (18 meses de idade).

Em ambos os gráficos, os pontos preenchidos indicam a detecção de ARN viral, e os pontos sem preenchimento referem a não detecção do mesmo. A área a sombreado, indica o limite de detecção da carga viral nos testes realizados.

4.1.2.1. Pontos que podem ter contribuído para a demora na recidiva

- A TARV na bebé 30 horas após o nascimento, é considerada por alguns investigadores como sendo uma profilaxia de pós-exposição (PEP). Isto é referido pois, tendo a terapêutica sido dada logo após o nascimento da criança e a qual possuía ainda um SI frágil (dado se tratar de um recém-nascido), era como se ela tivesse sido infectada há relativamente pouco tempo, restringindo e limitando assim a infecção com a utilização da terapêutica (profilaxia de pós-exposição). (CATIE, 2013; Hammer, 2013)
- O facto da mãe estar infectada com um subtipo comum de HIV (subtipo B), a probabilidade de se controlar melhor o vírus e fazer com que ele “desapareça” é maior. (CATIE, 2013)
- Segundo a equipa de investigação, a mãe também não amamentou a criança e dado que esta também é uma forma de transmissão do vírus, este pode ter sido mais um factor que contribuiu para o resultado apresentado neste caso. (CATIE, 2013)

4.1.3. Outros casos de tratamento precoce

Um outro caso recente e idêntico é o de um bebé que Long Beach, na Califórnia. Neste, a terapêutica foi realizada 4 horas após o nascimento (passando por zidovudina, lamivudina e nevirapina, com um suplemento de lopinavir 2 semanas depois). A nevirapina foi descontinuada 3,4 meses após o início da terapêutica e os restantes fármacos mantiveram-se. Até ao momento nenhuma carga viral foi detectada. Porém, neste caso, o bebé não interrompeu a TARV, mas a esperança de que a infecção possa estar curada, continua a estar presente. (Jefferys et al., 2014; Qian et al., 2014)

Neste caso, a mãe do bebé estava num estado avançado da infecção na altura do parto, com 138,811 cópias de ARN/ml de sangue e um número de células T CD4⁺ de 70 células/mm³. Apesar de ter sido prescrita TARV a mãe não teve adesão. (Jefferys et al., 2014)

Anti-retrovirais foram administrados durante o parto, todavia, o bebé foi infectado.

Os níveis de carga viral do bebé após 11 dias foram indetectáveis (<20cópias/ml de sangue) e os testes ao ADN e à replicação competente viral, tiveram todos resultados

negativos. A técnica de PCR para o ADN viral, mostrou níveis inferiores a 1,6 cópias por milhão de células mononucleares periféricas. (Jefferys et al., 2014)

Se os níveis de HIV se mantiverem indetectáveis até aos 2 anos de idade, os médicos estão a ponderar em interromper a terapêutica. (Jefferys et al., 2014)

Num estudo coorte com 144 crianças e com uma média de idades de 14,3 anos, estas foram divididas em 3 grupos de acordo com a altura em que a supressão viral foi atingida. Destas, 14 atingiram a supressão viral 1 ano após o nascimento, 53 obtiveram-na 1-5 anos depois de nascer e 77 conseguiram-na passados 5 anos. (Jefferys et al., 2014)

A quantidade de ADN pró-viral detectado em cada grupo foi: 4,2 cópias; 19,4 cópias; e 70,7 cópias por milhão de células polimorfonucleares respectivamente. Foi indicado também que, a dado o tamanho limitado do reservatório viral nas crianças e adolescentes com tratamento iniciado precocemente, permite que estes sejam bons candidatos para estudos de cura, dado que o número de células de latência infectadas é muito pequeno. (Jefferys et al., 2014)

A TARV iniciada logo após a infecção, como relatada nestes casos, deverá ser implementada devido aos vários os benefícios já relatados. Pelo que, alterações na forma de tratamento de recém-nascidos de mães infectadas por HIV em todo o mundo deverão ser postas em prática. (Qian et al., 2014)

4.1.4. Um caso de tratamento em estado avançado da infecção

A TARV se iniciada precocemente pode levar a uma cura funcional como já anteriormente foi referido. Contudo, existem casos relatados de pessoas em estágios já avançados da doença e que tenham atingido a cura funcional.

Este é o caso de uma senhora de 51 anos, na Argentina, que iniciou a TARV já num estado avançado da infecção e que tem níveis indetectáveis de carga viral, e reduzido número de células T CD4⁺ infectadas após a interrupção do tratamento, há mais de 7 anos. Este é um caso de seroconversão e cura funcional, sugerindo que existe a probabilidade de controlo da infecção mesmo já em estado avançado com tratamento. Mais estudos de análise das células de latência desta senhora estão a ser realizados, de modo a que se possa explicar este caso. (Collins, 2014)

4.1.5. Transplante como terapêutica - Os doentes de Boston

Outro caso de interesse foi o dos dois indivíduos de Boston (HIV-positivos que faziam TARV), e que foram submetidos a um transplante de células estaminais hematopoiéticas halogénicas (de dadores que tinham a espécie "selvagem", ou seja, sem mutação do co-receptor CCR5), por possuírem um linfoma. Após a realização deste processo cirúrgico, novos testes de monitorização foram realizados para verificar a carga viral dos indivíduos, tendo-se observado que o ADN de HIV-1 estava indetectável nas células mononucleares do sangue periférico e no tecido rectal enquanto os mesmos faziam TARV. Contudo, quando pararam a terapêutica anti-retroviral, o vírus voltou embora mais tarde que as típicas 1-4 semanas (num dos infectados demorou 12 semanas e no outro 32). (Barré-Sinoussi et al., 2013; Lewin et al., 2014; Lewin, 2014a, 2014b; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Os doentes de Boston eram heterozigóticos para a mutação dos alelos $\Delta 32$ no gene CCR5, mas isto não lhes conferiu qualquer protecção após a interrupção da TARV, pelo que este caso não é idêntico ao do doente de Berlim. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Isto indica, que provavelmente a terapêutica anti-retroviral utilizada por ambos os doentes, protegeu as novas células recebidas do transplante de ficarem infectadas também com o vírus, enquanto as células do hospedeiro (inclusivamente as células infectadas) eram eliminadas pela quimioterapia e pela a doença do enxerto contra o hospedeiro que também os afectou (em que as células do dador(transplantadas) atacam as células do hospedeiro). Após a paragem da TARV, observou-se uma diminuição do reservatório viral de pelo menos 3 log, que apenas permitiu um atraso no aparecimento da recidiva. Como referido, mais tarde a virémia acabou por subir e embora num período mais tardio que o normal, isto permite afirmar que a replicação dos vírus competentes continuou a dar-se em tecidos que não foram analisados. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Jefferys et al., 2014; Lewin et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Assim sendo, é possível dizer-se que a TARV utilizada anteriormente ao transplante, pode ter favorecido o não aparecimento imediato da infecção, conseguindo controlar a mesma. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Lewin et al., 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

4.1.6. Transplante em 10 doentes HIV-positivos com linfoma

Uma mesma tentativa de transplante com 10 doentes HIV-positivos e linfoma, foi realizada na Pensilvânia e na Califórnia. Estes sofreram também quimioterapia durante o processo terapêutico. Contudo, nos testes de monitorização de carga viral após o transplante, os dados verificados foram os de que o ARN viral tinha sido detectado em 9 dos 10 pacientes, e o ADN viral tinha sido detectado em todos. Mesmo após 10 anos de monitorização, a proporção de células infectadas dos doentes nunca diminuiu após o transplante. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013)

4.1.7. Quais as razões que levaram a que a infecção persistisse?

A quimioterapia utilizada, pode não ter funcionado, pois este tratamento tem como intuito a destruição células em rápida divisão (células tumorais). Os reservatórios celulares de HIV existentes no sistema imunitário, podem por sua vez não estar activos, e portanto dessa forma, a quimioterapia não os elimina, pelo que, o número de células infectadas permanece idêntico. (CATIE, 2013)

A outra hipótese que está relacionada com o transplante dado que algumas células transplantadas poderiam conter algumas células infectadas com HIV, pelo que a infecção poderia ser restabelecida. (CATIE, 2013)

4.2. Estudos para a cura real

Esta consiste na eliminação completa do vírus incluindo-se a eliminação dos reservatórios celulares, de modo a que não ocorram recidivas. Ou seja, esta forma de cura consta na erradicação completa do vírus do organismo e é considerada por muitos, como a mais difícil de alcançar num futuro próximo. (A. Fauci et al., 2014; Lewin, 2014a)

4.2.1. Tratamentos baseados em transplantes de células estaminais

4.2.1.1. O doente de Berlim

Este foi um caso de extrema relevância para a comunidade científica, pois foi o único caso de cura real considerado de sucesso até à data. (Lewin, 2014a; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Neste caso o indivíduo (HIV-positivo) sofrendo de leucemia, passou por quimioterapia e radioterapia, seguindo-se um transplante de células estaminais da medula óssea de um

dador com a mutação $\Delta 32$. Posteriormente a quimioterapia, a radioterapia e a TARV foram paradas. O transplante não foi bem aceite pelo organismo do doente (e este passou pela doença enxerto contra o hospedeiro (GvHD)). Com isto, ele teve que tomar potentes fármacos imunossuppressores de modo a controlar a doença, isto é, de forma a que o seu organismo aceitasse o transplante. Mais tarde, o cancro voltou e ele teve que retomar a quimioterapia e fazer mais um transplante de células estaminais. (CATIE, 2013; Lewin, 2014a, 2014b; Persaud et al., 2013; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Após todas estas intervenções, ele ficou curado do cancro e os testes de monitorização de HIV sofisticados indicaram que ele também já não tinha a infecção, ou tinha níveis muito baixos do vírus de tempos a tempos, e isto na ausência de TARV. (CATIE, 2013; A. Fauci et al., 2014; Lewin, 2014b; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Actualmente, os investigadores para além de tentarem reproduzir os mesmos resultados em apenas doentes com cancro (dado este tratar-se um processo de risco e dispendioso) mas sem uma resposta idêntica, tendem a especular sobre os resultados que podem ter levado à aparente cura deste doente de Berlim. (CATIE, 2013; Qian et al., 2014)

4.2.1.1.1. Factores que podem ter promovido à aparente cura do doente de Berlim:

- Receber um transplante de células estaminais de um indivíduo com a mutação $\Delta 32$ que impede a entrada do vírus com tropismo para o co-receptor CCR5, já anteriormente referido;
- A intensa dosagem de quimioterapia e radiação anterior ao transplante devido ao cancro que também possuía;
- A doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) que este sofreu após o transplante e que alguns investigadores acreditam ter potenciado a destruição certos reservatórios de células infectadas com HIV;
- O uso de imunossuppressores para combater a GvHD (suprimindo as reações de inflamação do organismo ao transplante recebido) que ao impedirem a inflamação, reduziram a capacidade do HIV de infectar as células. (CATIE, 2013)

A utilização de corticosteróides, tendo estes actividade imunossupressora pode parecer contra produtivo em pessoas HIV-positivas devido aos imensos efeitos secundários

destes fármacos. Contudo, alguns ensaios clínicos indicam que a utilização dos mesmos em baixas doses pode trazer benefícios, dado que a inflamação crónica e a activação imunitária provinda da Sida, pode ser atenuada com estes fármacos que vão actuar reduzindo a inflamação e outras disfunções imunológicas incitadas pelo vírus. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013)

4.2.1.2. Caso de transplante numa criança

Um outro caso a referir é o de um rapaz de 12 anos com uma leucemia linfoblástica aguda, o qual também foi sujeito a um transplante de células estaminais do cordão umbilical de um dador homozigótico para a mutação $\Delta 32$ do gene CCR5, tentando com este procedimento também curar a infecção por HIV da qual também era portador. Porém, o rapaz não aguentou e acabou por falecer dois meses após o transplante com a doença do enxerto contra o hospedeiro. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.2. Terapia genética

Nos últimos anos, novas tecnologias de reconhecimento que têm como alvo determinadas sequências de ADN, e que permitem a edição de um gene num local específico surgiram. Fala-se de: nucleases de dedos de zinco (ZFN), *Transcription Activator-like Effectors Nucleases* (TALEN) e o sistema CRISPR/Cas9. A mais recente é a CRISPR/Cas9 que usa uma curta extensão do ARN complementar ligado à nuclease Cas9 para reconhecer e clivar o alvo de ADN, contrariamente às outras intervenções que utilizam compostos de ligação ao ADN. Nos casos das ZFN, ou das TALEN, estas fundem-se com uma endonuclease para mediar a clivagem de uma sequência específica de ADN. Estas novas tecnologias, permitem a disrupção permanente do gene alvo após um único tratamento. (Manjunath, Yi, Dang, & Shankar, 2013; Qu et al., 2014; Van Lint et al., 2013)

Com isto, modificações ao nível das células T $CD4^+$ tornando-as resistentes ao HIV usando terapêutica genética, poderá ser outra estratégia a ponderar na busca da cura para o vírus. (Lewin, 2014b)

4.2.2.1. Estudo com o VRX496

Este estudo tinha por base a criação de células T $CD4^+$ mais resistentes aos efeitos destrutivos da infecção por HIV. Assim, o intuito deste era infectar células T $CD4^+$ com material genético de modo a formular proteínas virais deficientes. Nisto, as células eram

tratadas com VRX496 e infectadas com HIV, produzindo posteriormente cópias de proteínas defeituosas. (CATIE, 2013)

Assim, num dos casos com 5 pessoas HIV-positivas a fazer TARV (mas a qual estava a falhar), os investigadores injectaram de forma intravenosa única, células T CD4⁺ tratadas com VRX496, do qual resultou um nível de virémia mais baixo e níveis de células TCD4⁺ um pouco mais altos. Além disso este método verificou-se seguro e por conseguinte, a utilização de mais que uma dose, poderia provavelmente aumentar a efectividade desta terapêutica. (CATIE, 2013)

No entanto, num outro estudo mais recente, envolvendo 17 pessoas HIV-positivas, e em que todos estavam a fazer TARV o nível viral aumentou primeiro quando estes pararam a TARV e depois baixou, mas sem saber porquê as células infundidas abandonaram o organismo de muitos dos indivíduos em semanas. Noutros elas permaneceram em pequenas quantidades durante 5 anos após infusão. Mostrou-se também que fazer mais do que 3 infusões intravenosas, não fazia as células ficarem mais tempo no organismo. (CATIE, 2013)

Todavia, mais tarde, verificou-se que este abandono das células do organismo, poderia ter sido causado pela não utilização de quimioterapia e de radiação. Pelo que, para considerar esta terapia, muita pesquisa ainda terá que ser feita e considerada, dado que tanto a quimioterapia como a radioterapia possuem imensos efeitos secundários que são tóxicos para o organismo. (CATIE, 2013)

4.2.2.2. Terapêutica de actuação em vários pontos

Um outro estudo baseado em terapia genética que que ligou investigadores de vários países, foi pensado ser posto em prática em 2013, e tinha em conta a interferência com as proteínas Tat, Rev e Vif do HIV e, além disso, o bloqueio o co-receptor CCR5. Desta forma, protegia-se não só a célula da entrada do vírus, como também se podia ajudar o sistema imunitário a superar o efeito tóxico das proteínas virais. (CATIE, 2013)

4.2.2.3. Um sucesso alcançado (nuclease de dedos de zinco)

Finalmente um sucesso foi alcançado com a terapia genética. Resultando numa estável, potente e transmissível resistência ao HIV provada tanto *in vitro* como *in vivo*, foram aplicadas alterações nas células eliminando o co-receptor CCR5, em modelos animais utilizando ratos. (Gu & Chen, 2014; Lewin et al., 2014; Qu et al., 2014)

Os dedos de zinco encontram-se ligados a um domínio nuclease, denominado Fok1 (uma endonuclease de restrição) dando origem às nucleases de dedos de zinco. (Manjunath et al., 2013)

As nucleases de dedos de zinco (ZFN), apresentam a capacidade de se ligar a regiões específicas do ADN (região U3, que é uma região bastante conservada do LTR), clivando-o através da Fok1, e conseguindo desta forma regular a expressão de determinados genes (como a inibição da expressão do gene CCR5 nas células hematopoiéticas CD34⁺ e nas células T CD4⁺, que impede a iniciação da replicação viral). Desta forma, evita-se a clivagem de zonas não específicas do ADN. (Lewin, 2014b; Manjunath et al., 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014; Qu et al., 2014; Van Lint et al., 2013)

A Fok1 torna-se activa após dimerização. Com isto, os dedos de zinco ligam-se a sítios opostos na sequência de ADN e rompem a cadeia *sense* e *antisense*, com um espaço para colocar as unidade da Fok1 e iniciar a clivagem da dupla cadeia nessa região (Figura 6). Uma vez feita esta ruptura estimulam-se os mecanismos de reparação celular do ADN que podem originar mutações de inserção, deleção e substituição, levando à destruição do gene. (Manjunath et al., 2013)

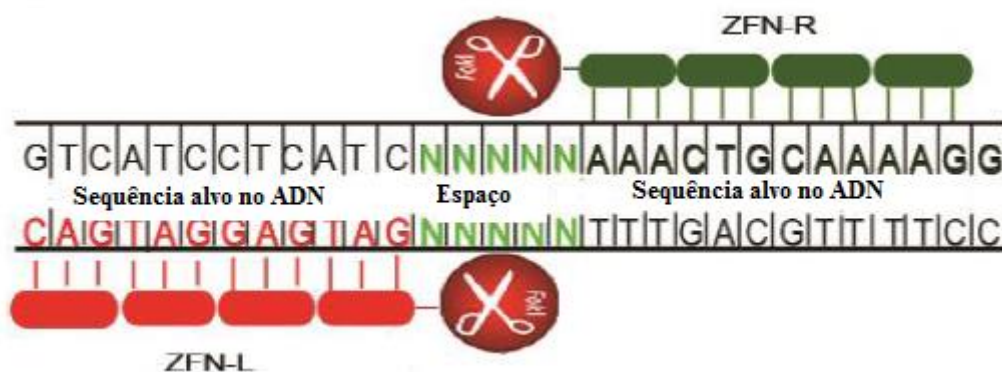


Figura 6: Representação esquemática do ZFN a ligar-se à dupla cadeia de ADN. Cada dedo de zinco reconhece 3 nucleótido de ADN e cada módulo de ZFN (R- direito,L-esquerdo) reconhece 9-18 nucleótidos. Quando os módulos de ZFN se ligam ao ADN a Fok1 sofre uma dimerização e cliva o ADN na região de espaço. Adaptado de (Manjunath et al., 2013)

A especificidade de ZFN é bastante importante, dado que erros na mesma podem levar a sérios problemas como cancro. Contudo, foi analisado que a ligação ZFN-U3 era segura e específica. Este composto poderá ser utilizado na inibição do HIV-1 e poderá verificar-se uma estratégia terapêutica, na erradicação viral, que em última instância curará os indivíduos infectados. Contudo, esta terapêutica ainda está longe de poder ser

cl clinicamente utilizada, pois muito mais estudos deverão ser realizados, para comprovar a eficácia e tolerabilidade deste composto sobre esta região específica. (Qu et al., 2014)

Num estudo realizado por June e colaboradores, em 12 pessoas HIV-positivas (sem virémia detectável) e a fazer TARV, células T CD4⁺ foram modificadas *in vitro* (denominando-se SB-728-T) e seguidamente infundidas. Estas células T CD4⁺, sofreram uma modificação funcional permanente no gene CCR5, através do ZFN, para a inexistência do co-receptor respectivo. Dos 10 biliões de células infundidas 11-28% eram células alteradas. Estas, foram assim transferidas de forma segura para a corrente sanguínea e para os tecidos. 6 destes 12 doentes, após a interrupção da TARV e 4 semanas depois da infusão destas células modificadas, tiveram recidivas. Num dos doentes, o ARN viral tornou-se indetectável e o ADN viral diminuiu em praticamente todos os indivíduos do estudo. (Gu & Chen, 2014; Lewin et al., 2014; Manjunath et al., 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014)

Também é necessário referir que estas células T CD4⁺ modificadas, sobreviveram mais tempo na presença do vírus activo e em replicação do que na as células não mutadas, sendo desde já um progresso. (Gu & Chen, 2014; Lewin et al., 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014)

Os ZFNs apesar de terem sido primeiramente desenhados para actuar sobre o gene CCR5, já outros genes de actuação foram também utilizados. O gene CXCR4 é outro gene cuja expressão também já pode ser influenciada por estes compostos. A construção de células T CD4⁺ resistentes a ambos os subtipos víricos já foi passível de ser verificada (tanto *in vitro* como *in vivo* a partir de ratos humanizados) . Desta forma, o risco de se desenvolverem modificações no tropismo viral é menor, dado que ambos os co-receptores são inibidos. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Qian et al., 2014; Van Lint et al., 2013)

Isto indica que modificações importantes ao nível das células T apresentam-se como uma estratégia factível e segura para o doentes HIV-positivos e podem proporcionar a diminuição no tempo de utilização da TARV, permitindo quiçá, num futuro próximo, a obtenção de uma cura funcional. (Qian et al., 2014)

4.2.2.4. Transcription Activator-like Effectors Nucleases(TALENs)

As TALEN são proteínas que se ligam a sítios específicos do ADN, conseguindo da mesma forma que os ZFN proceder à clivagem do mesmo. Estas são derivadas de

bactérias patogénicas de plantas (xantomias). Sendo proteínas, estas apresentam uma zona N e C terminal e um domínio central de activação fundido com a endonuclease Fok1, como os ZFN, que lhe permite a ligação específica ao ADN. (Manjunath et al., 2013)

No entanto enquanto nos ZFN cada dedo (contendo 30 aminoácidos) reconhecia 3 nucleóticos, nestes compostos 34 aminoácidos reconhecem apenas 1 nucleótido. O reconhecimento específico do ADN é obtido pela grande variabilidade de aminoácidos na posição 12 e 13 denominados *repeat variable diresidues* (RVDs). Após estes RVDs se ligarem com as respectivas sequências de nucleótidos, ocorre uma dimerização da Fok1 e a clivagem do ADN, com a posterior reparação das duas cadeias clivadas, como nos ZFN, com consequente destruição do gene. (Manjunath et al., 2013)

A única tentativa de utilizar os TALEN como terapêutica génica de HIV-1 foi feita em 2011 por Mussolino e colaboradores que compararam o bloqueio do gene CCR5 feito pelas ZFN e as TALEN em 293 células T. Em ambos os compostos se obteve cerca de 45% de ruptura no gene. Contudo, as TALEN demonstraram uma muito menor citotoxicidade e uma diminuição da actividade em outros genes que não eram o alvo como o CCR2, pelo que se demonstraram muito mais promissoras em terapêutica que as ZFN. Assim, muitos mais estudos devem ser feitos, para provar esta especificação de alvo e a eficácia deste composto. (Manjunath et al., 2013)

4.2.2.5. Sistema CRISPR/Cas9

Os genomas bacterianos têm um locus codificador denominado *clustered regularly interspaced palindromic repeats* (CRISPR), que consiste numa série de repetições curtas, em média de 32 nucleótidos intercalados com espaçadores intervenientes curtos, os quais variam em sequência. Este CRISPR está associado a uma proteína Cas que vai permitir a clivagem posterior do ADN. Este método é o utilizado pelas bactérias para destruir os plasmídeos ou fagos, ou para invadir um hospedeiro induzindo virulência bacteriana. (Manjunath et al., 2013)

Este sistema pode ser um potencial para a edição de genes nas células humanas.

Uma vantagem deste sistema CRISPR/Cas9, é que a Cas9 que é uma porção comum disponível em clonagem. Assim, a única necessidade aqui implícita, consiste expressar a pequena parte do ARN do gene de interesse a clivar, dando a este método uma grande vantagem relativamente aos outros. Também tem uma grande versatilidade, dado

corresponder a parte do SI, este está naturalmente propenso a ligar-se simultaneamente a vários locais de genes, induzindo a clivagem de uma grande quantidade de um gene. (Manjunath et al., 2013)

4.2.3. Inibidores da histona diacetilase (HDACi)

A maior barreira à cura do HIV, consiste na presença das células de latência T CD4⁺ que carregam o genoma viral mas cuja transcrição deste é "silenciosa". Isto é, os níveis de replicação viral nestas células são baixos, pois elas não se encontram constantemente activadas. Só após activação celular, é que esta transcrição é iniciada e a replicação viral se dá, sendo mais vírus libertados. (J. D. Siliciano & Siliciano, 2014; Wei et al., 2014)

O facto do HIV conferir um estado de latência nestas células, permite que o reservatório viral se mantenha. (Hanauske-Abel et al., 2013; Wei et al., 2014)

Quando verificada esta latência celular, procederam-se a métodos longitudinais de análise para revelar a taxa de decaimento do reservatório viral. Através destas análises foi descoberto que estas células tinham um tempo de semi-vida de 43,9 meses, e foi estimado que seriam necessários 73 anos de TARV para erradicar o reservatório celular. Também se verificou após análise estatística que o número de células de latência era muito superior (60 vezes maior) ao anteriormente indicado (1/10⁶ células T CD4⁺, era de latência), descobrindo assim, que a erradicação do reservatório viral seria ainda mais desafiadora do que o anteriormente previsto. Assim, mesmo com terapêutica anti-retroviral de longa duração é improvável a obtenção de uma cura. (Ho et al., 2013; Ruelas & Greene, 2013; Wei et al., 2014)

Desta forma, como já foi referido anteriormente, a activação celular tem sido explorada como um meio para eliminar estes reservatórios celulares. (Wei et al., 2014)

A teoria “shock and kill” em que a latência é revertida, tem ganhado cada vez mais adesão nas investigações actuais. Esta teoria consiste na activação da expressão viral que dá origem a uma consequente reactivação celular, e por sua vez, a morte destas células infectadas através da clearance imunitária ou mesmo com a ajuda de TARV. Contudo, a toxicidade revelada pela libertação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias pelas células T activadas, colocaram a investigação de compostos que originam a reactivação celular num patamar mais restrito e tentando apenas reactivar as células infectadas, ou seja, evitando a activação global celular. (Lewin, 2014a; Shan et al., 2012; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

As histonas diacetilase (HDAC) permitem que o HIV se mantenha nos reservatórios celulares num estado de latência. As HDAC são recrutadas para a subunidade 5'LTR do HIV por vários reguladores transcricionais e pelos resíduos de lisina diacetilase das histonas, induzindo a condensação da cromatina, que impede a acessibilidade dos factores de transcrição celulares e portanto, a repressão da transcrição viral. (Rasmussen et al., 2013a; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014; Stevenson, 2013; Wei et al., 2014)

As histonas acetil transferases medeiam a adição de grupos acetil às histonas, reduzindo a condensação da cromatina e promovendo à transcrição celular. Por sua vez, as histonas diacetilases, removem estes grupos acetil, reprimindo o processo de transcrição. Assim o equilíbrio entre as histonas acetil transferases e as histonas diacetilases poderá ser a chave deste estado de latência viral (Figura 7). (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Rasmussen et al., 2013a)

Assim, inibindo a enzima histona diacetilase, será natural que estas células sejam reactivadas, removendo-as do estado de latência criado, e mais cópias de HIV sejam formadas. No entanto, a utilização deste inibidor da histona diacetilase (HDACi) deve ser conjugado com a terapêutica anti-retroviral uma vez que a activação dos reservatórios celulares poderá consequentemente infectar novas células, e para evitar que tal aconteça, deve-se assim combinar as duas terapêuticas (anti-retroviral e o inibidor da histona diacetilase). Com isto, os investigadores esperam conseguir reduzir o número de células infectadas e mais difícil que isso, os reservatórios celulares, ou se possível, mesmo eliminá-los. (CATIE, 2013; Lewin et al., 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

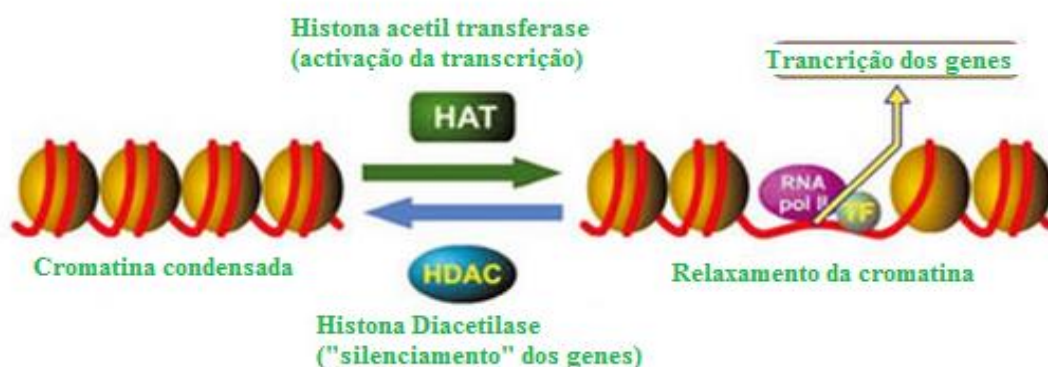


Figura 7: Modelo simplificado de transcrição genética. Adaptado de (McIntyre, Moral, & Bozzo, 2007)

4.2.3.1. Ácido Valpróico

A primeira molécula HDACi foi o ácido valpróico. Este fármaco antiepiléptico, revelou inicialmente permitir uma diminuição nas células T CD4⁺ em repouso infectadas com o vírus HIV, em 4 pessoas, após 16 semanas de tratamento. No entanto, outros estudos com o mesmo fármaco, não revelaram as mesmas evidências e uma eficiência idêntica. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Shan et al., 2012)

4.2.3.2. O dissulfiram

O dissulfiram usado para tratar dependência a alcoolémia, foi também utilizado em estudos como fármaco anti-retroviral nos final dos anos 80, início dos 90. Contudo a ideia foi abandonada, devido a resultados divergentes. Hoje em dia, os investigadores começaram a olhá-lo de outra forma, porque algumas experiências celulares mostraram que ele parece activar as células de latência. (CATIE, 2013)

Num estudo piloto de duas semanas, este fármaco provou que uma dose diária dada a pessoas HIV-positivas a fazer TARV, demonstrou uma boa tolerabilidade e aumentou os níveis plasmáticos de ARN viral. (Katlama et al., 2013)

4.2.3.3. Estudos com o Vorinostat

Um estudo foi realizado com 3 macacos *rhesus* VIS-positivos a fazer TARV, e no qual se utilizou ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) ou vorinostat nome pelo qual também é conhecido, durante 3 semanas. (Ling et al., 2014)

Após 7semanas da infecção, iniciou-se a TARVc com TNF, FCT, um IIN, e um IP. O nível de virémia decresceu para <30 cópias/ml de sangue durante a TARV, com picos de virémia ocasionais, que podem resultar da incompleta penetração da TARV em certos tecidos como mais à frente será abordado. (Ling et al., 2014)

Esta diminuição da replicação viral observou-se tanto no sangue, como nos nódulos linfáticos e inclusive no GALT. Também se reduziu a activação imunitária com parcial restauração das células T CD4⁺ intestinais. (Ling et al., 2014)

Porém, mesmo com a TARVc por um ano, a persistência ADN e ARN viral manteve-se nos tecidos dos 3 animais infectados. (Ling et al., 2014)

O vorinostat utilizado nas últimas 3 semanas de tratamentos, foi bem tolerado, mas não demonstrou alterações no ARN viral no plasma ou nos tecidos. Estes resultados podem ter provindo na baixa dose utilizada (correspondendo a doses subterapêuticas), nas

amostras que foram retiradas e as quais não verificaram alterações, ou no reduzido número de animais que foi empregue no ensaio. (Ling et al., 2014)

Doses únicas de Vorinostat, poderão ser mais efectivas na indução da reactivação dos vírus em latência do que doses diárias administradas durante as 3 semanas como foi o caso deste estudo. (Ling et al., 2014)

Dois estudos em pessoas foram realizados, no sentido de averiguar o efeito deste inibidor da histona diacetilase. (CATIE, 2013; Lewin, 2014a)

Num primeiro estudo, efectuado em 8 doentes, uma dose oral única de 200 mg foi dada. Passadas quatro semanas, deu-se mais uma dose de 400 mg e após mais quatro semanas uma nova dose de 400 mg foi dada. Foram retiradas amostras sanguíneas antes e depois da administração de cada dose do fármaco. Foi verificado, que a dose de 400 mg aumentava bastante a replicação viral nas células de latência, indicando por conseguinte, que a activação dos reservatórios celulares foi conseguida, nos 8 indivíduos. (CATIE, 2013; Katlama et al., 2013; Lewin et al., 2014)

No entanto, os indivíduos escolhidos para este estudo, foram seleccionados de 16, de acordo com a demonstração da sua produção viral após a utilização de 335nm de vorinostat num ensaio de estimulação *ex vivo*. Pela situação apresentada, seria natural que uma selecção randomizada dos indivíduos tivesse tido menos impacto. (Katlama et al., 2013; Rasmussen et al., 2013b)

O outro estudo foi conduzido num período de duas semanas com uma dose diária de 400 mg em que os doentes foram monitorizados por um período de três meses. (CATIE, 2013)

Foram recrutadas 20 pessoas HIV-positivas que já tomavam TARV há pelo menos 3 anos e cujos níveis de células T CD4⁺ eram superiores a 500 células/mm³ e a carga viral era inferior a 50 cópias/ml de sangue. A amostra era constituída por uma média de idades de cerca de 48 anos; 19 homens e 1 mulher; 14 utilizavam como regimes de terapêutica anti-retroviral nevirapina ou efavirenz, e os restantes faziam regimes com IPs. Como resultado final, verificou-se que 90% dos doentes aumentaram os níveis de produção de HIV (aumentando o ARNm detectado) a partir da activação das células de latência; não houve aumentos significativos de novas infecções celulares no sangue ou no tecido rectal; os doentes não desenvolveram níveis significativos de activação celular (células T) após a exposição ao Vorinostat. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013;

Garrido & Margolis, 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

Nos dois estudos, o vorinostat conseguiu activar os reservatórios celulares e a sua utilização foi segura. Também não foram detectados efeitos secundários graves. Porém, estudos de longo-prazo são necessários para verificar o impacto que existe nas células de latência. (Barré-Sinoussi et al., 2013; CATIE, 2013)

A exposição limitada ao vorinostat, não curou o HIV, e por isso, ainda muito trabalho terá que ser feito, talvez até combinando várias terapêuticas, no sentido de “limpar” mais eficientemente estes reservatórios virais. (CATIE, 2013; Garrido & Margolis, 2014)

4.2.3.4. Panobinostat

O panabinostat é um inibidor da histona diacetilase (HDACi) que apresentou uma reactivação da expressão de HIV nas linhas celulares em células de latência, e nos reservatórios celulares T CD4⁺. Este fármaco apresentou efeito a concentrações tão baixas como 8-32 nm, que estão abaixo dos níveis clínicos de dose oral. E os níveis de inibição da enzima são bastante longos (7 dias após a segunda administração), reduzindo assim a o número de doses a administrar.

Um estudo *in vivo* com este fármaco, com duração de 8 semanas, foi comandado na Aarhus University Hospital, na Dinamarca para verificar a sua funcionalidade na expressão de HIV e no tamanho do reservatório viral (NCT01680094).(Rasmussen et al., 2013a)

4.2.3.5. Estudo com Romidepsine

O romidepsine é um péptido cíclico, naturalmente sintetizado pelo *Chromobacterium violaceum* que é utilizado para o tratamento de linfomas periféricos ou linfomas cutâneos. (Wei et al., 2014)

Contudo, estudos comprovaram, que quando utilizado em dosagem mais baixa, o mesmo tem a capacidade de activar células em estado de latência na infecção por HIV. Dada a sua aplicação em dosagem inferior no caso da reactivação celular, os efeitos secundários associados a este fármaco, poderão ser reduzidos ou mesmo eliminados relativamente ao seu uso em terapêutica oncológica. (Wei et al., 2014)

O romidepsine, actua como pro-fármaco, e de modo a realizar a sua função, ocorre uma redução das suas ligações dissulfito intracelulares, após a sua entrada nas células. Posteriormente, com a libertação dos seus grupos sulfidriilo, ocorre uma interacção bastante forte (do agora fármaco) com o ião zinco que se apresenta no local acção de vários análogos da histona diacetilase. O mecanismo de actuação que leva a inibição desta enzima por parte do romidepsine, não é o mesmo do vorinostat, como também pode não ser idêntico para outros inibidores. (Wei et al., 2014)

Num estudo efectuado em células extraídas de 46 indivíduos HIV-positivos e a fazer TARV, com número de células T CD4⁺ >350 células/mm³, e a carga viral < 50 cópias/ml de sangue, foi verificado que o fármaco mais potente em termos de reactivação de células de latência foi o romidepsine (comparativamente a panobinostat, givinostat, vorinostat e mocetinostat). (CATIE, 2013)

A dosagem que indicam poder ser utilizada para reactivar os reservatórios celulares deverá estar entre 2-5 mg/m² de superfície corporal, administrando-se de forma intravenosa. (CATIE, 2013)

Assim, após efectividade demonstrada, ensaios clínicos futuros são esperados para este fármaco. (CATIE, 2013; Lewin et al., 2014)

Um outro estudo mais recente, foi feito em células T CD4⁺ de doentes infectados com HIV e a fazer terapêutica anti-retroviral (por mais de 12 meses), com carga viral <50 cópias/ml de sangue, com um número de células T CD4⁺ >350 células/mm³ e na ausência de co-infecções (hepatite B ou C). (Wei et al., 2014)

Neste, as células de memória foram isoladas dos doentes e tratadas com Romidepsine ou Vorinostat, por 4 ou 24 horas respectivamente. Seis dias após o início do tratamento, as células foram analisadas e comparadas com o grupo controlo que correspondia às células que apenas estavam submetidas a TARV. (Wei et al., 2014)

Com este, foi provado que enquanto o romidepsine aumentou seis vezes mais os níveis de ARN viral com uma dosagem de 40nm em 4 horas, o vorinostat em 24 horas e com uma dosagem de 1µm, apenas aumentou 2/3 o nível replicação normal. Além disso, a activação celular com romidepsine durou cerca de 48 horas, enquanto que a activação celular do vorinostat ou diminui bastante ao fim de 24 horas. (Wei et al., 2014)

Também se verificou que o romidepsine activa a expressão das células em estado de latência infectadas com HIV mas não induz a activação global nas células T ou B. Além disso, não activa potentes citocinas, como o IFN- α , TNF- α , IL-2, etc, não levando a uma reacção extensa de inflamação. (Wei et al., 2014)

Este estudo garante a eficácia na utilização do romidepsine na supressão viral dos doentes infectados. (Wei et al., 2014)

Num estudo mais recente, realizado por Ole Schmeltz Søgaaard da Universidade de Aarhus na Dinamarca, este fármaco foi testado para verificação da sua eficácia e segurança na activação viral em pessoas. (Cohen, 2014; Highleyman, 2014; Søgaaard et al., 2014)

Desta forma, 6 pessoas HIV-positivas (5 homens e 1 mulher), com uma média de idades de 54 anos e a fazer TARV por uma média de 9,5 anos (mas não tendo sido a mesma iniciada aquando da infecção aguda), com uma carga viral <50 cópias/ml de sangue e uma média de células T CD4⁺ de 760 células/mm³, receberam 3 infusões semanais de romidepsine (com uma dosagem de 5mg/m²) nos dias 0, 7 e 14, sendo que houve um seguimento dos doentes até ao dia 21. (Highleyman, 2014; Søgaaard et al., 2014)

Como resultado, pôde-se verificar que este fármaco anticancerígeno conseguiu activar de forma segura a transcrição do HIV (aumentando significativamente os níveis de ARN viral nas células T CD4⁺, bem como o nível de ARN viral no plasma), observando-se então que a activação dos reservatórios celulares é possível. No entanto, também foi verificado, que não ocorre diminuição do tamanho do reservatório viral após activação celular, sugerindo por conseguinte, que para a obtenção de uma possível cura, não existe só a necessidade de reactivação das células de latência T CD4⁺ (obtida com a utilização deste fármaco), como também é necessário o reforço da resposta do sistema imunitário contra a vírus. (Cohen, 2014; Collins, 2014; Highleyman, 2014; Søgaaard et al., 2014)

De momento, um estudo combinando romidepsine e uma vacina que promova à estimulação da resposta imunitária (Vacc-4x, vacina como imunoterapia de HIV) encontra-se em curso. Com este procura-se obter um golpe-duplo: no reservatório viral, permitindo que a vacina aumente a capacidade do SI para eliminar as células de latência, que por sua vez serão inicialmente reactivadas pelo romidepsine. (Cohen, 2014; Highleyman, 2014; Jefferys, 2014; Søgaaard et al., 2014)

A vacina é constituída por péptidos de regiões conservadas da proteína p24 viral e tem sido associada, a baixos valores de carga viral nas recidivas que acontecem após a interrupção da TARV. (Jefferys, 2014)

4.2.3.6. Perspectivas futuras

Apesar dos inibidores da histona diacetilase terem função específica sobre a histona diacetilase, eles também podem ter acção sobre outras enzimas. (CATIE, 2013)

A falta de especificidade dos HDACi é um problema dada a possível activação de outras fracções de genes a nível celular. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Os humanos apresentam mesmo sem infecção, "traços" no seu ADN, de retrovírus diferentes do HIV, que estão envolvidos connosco há milhões de anos. Contudo, estes "bocados" de ADN não são suficientes para causar uma infecção. (CATIE, 2013)

Porém, com utilização dos inibidores da histona diacetilase, a probabilidade de conjugação dos bocados já existentes de retrovírus do nosso próprio ADN com o HIV posteriormente proveniente das células activadas, tem que ter em conta, a possível formação de novos retrovírus. As consequências da formação destas estirpes virais, não são conhecidas. E, todavia, também não foram reportados casos de pessoas HIV-positivas a fazer inibidores da histona diacetilase em que tenham surgido novas estirpes virais. (CATIE, 2013)

Anteriormente ao estudo de romidepsine, as questões que se colocavam relativamente ao que poderia acontecer após activação das células de latência era que: as novas células activadas poderiam produzir várias cópias de HIV e depois morrer; ou que as mesmas poderiam começar a produzir cópias de HIV, o organismo (células T CD8⁺) identificá-las como sendo infecciosas e por conseguinte poderiam destruí-las; ou por fim, poderiam produzir uma pequena quantidade de HIV e depois voltar ao seu estado de latência com a capacidade de produzir mais HIV no futuro. (CATIE, 2013)

Com o estudo do romidepsine, novas respostas foram dadas relativamente a esta questão, e o que se concluiu foi que apesar de haver activação celular, o número de reservatórios não diminuiu, sugerindo que a terceira hipótese é a que parece estar mais correcta. No entanto, os cientistas tentam unir esforços de modo a criar uma forma de reforçar o SI, fazendo com que este seja posteriormente capaz de combater estas células agora activadas, trabalhando de modo a ir de encontro há segunda hipótese (como o caso da Vacc-4x). (Søgaard et al., 2014)

De qualquer forma, mais estudos sobre estes fármacos (inibidores das histona diacetilase) devem continuar e as questões devem continuar a ser colocadas, de modo a que novas respostas surjam pois só assim poderemos evoluir na busca para uma possível cura. (CATIE, 2013)

4.2.4. Agonistas da Proteína Cinase C (PKC)

Os agonistas da PKC (como o briostatina) que activam NF- κ B, são identificados como bons candidatos para reactivação celular junto com os HDACi. (Passaes & Sáez-Ciri3n, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

4.2.4.1. Briostatina

Recentemente, os investigadores descobriram que a Briostatina e outros fármacos idênticos poderão ter um papel importante na cura do HIV. Segundo estes investigadores, este fármaco parece influenciar as células de latência T CD4⁺ em diferentes tipos de células do sistema imunitário. (CATIE, 2013; Van Lint et al., 2013)

4.2.5. A análise de vários estudos

Num estudo realizado por Laird, da Universidade de Johns Hopkins, foram analisados agentes reversores da latência. Este testou 3 HDACi (vorinostat, romidepsine e panobinostat), e a briostatina (agonista da PKC). (Jefferys et al., 2014)

A replicação competente de HIV foi medida após estimulação das células T CD4⁺ em 11 de 13 dadores, no entanto, nenhum vírus foi detectado nas amostras expostas aos agentes referidos em cima. Também na quantificação o ARNm em cultura, não se obtiveram quaisquer valores detectáveis após a utilização desses agentes, a única excepção foi uma amostra de células T CD4⁺ de um indivíduo cujos níveis se verificaram detectáveis após a exposição a briostatina. (Jefferys et al., 2014)

É possível afirmar-se que nenhuma activação das células de latência T CD4⁺ em indivíduos HIV-positivos com carga viral suprimida e a fazer TARV, foi obtida. (Jefferys et al., 2014)

Contudo, este identificou possíveis sinergismos, quando associando agentes de reversão da latência, como a junção do vorinostat ou da romidepsine com a briostatina. (Jefferys et al., 2014)

Apesar dos efeitos tóxicos apresentados pela briostatina nas pessoas HIV-positivas, alguns benefícios foram também relatados e por conseguinte, outros compostos agonistas da PKC estão a ser estudados. (Jefferys et al., 2014)

4.2.6. Imunossupressores e fármacos citostáticos

4.2.6.1. Rapamicina

Um outro composto que mostrou ter actividade também sobre o HIV *in vitro*, foi a rapamicina. Este imunossupressor é utilizado em transplantes renais quando existem complicações com os inibidores de calcineurina. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Relativamente à infecção por HIV este demonstrou diminuir a expressão do gene CCR5 e interferir também com a síntese de transcrição viral, suprimindo a activação e a proliferação celular. Este fármaco também demonstrou resultados sobre a infecção provocada pelo vírus, reduzindo o número de células alvo activas e diminuindo a manutenção dos reservatórios celulares. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Num estudo em 14 doentes HIV-positivos que receberam um transplante renal e que experimentaram a rapamicina em monoterapia após o transplante, conseguiram controlar melhor a replicação de HIV do que aqueles fármacos que mantinham os inibidores de calcineurina. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Num outro estudo relatado em 2013 que analisou um grupo infectado com HIV e sujeito a um transplante renal, recebendo rapamicina, verificou uma diminuição de ADN viral após 2 anos do transplante comparativamente a outros doentes recebendo outros imunossupressores. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.6.2. Hidroxiureia

Um outro composto com actividade citostática é a hidroxiureia (antineoplásico e imunomodelador), que demonstrou regular a infecção em HIV, através da regulação da inibição da ribonucleotido redutase. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Observou-se também com este fármaco, inibição da síntese de ADN viral durante a transcrição reversa, contudo, o impacto ao nível dos reservatórios virais ainda não foi verificado. Um sinergismo com a Didanosina que reduz a carga viral de HIV em doentes, também foi verificado. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

No entanto, este fármaco demonstrou toxicidade em vários indivíduos HIV-positivos. Mas, há que referir, que a toxicidade observada pode-se ter devido à grande dosagem do

fármaco utilizada, e dado este factor, concentrações mais baixas poderão verificar-se preferenciais para os doentes HIV-positivos. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Apesar da toxicidade e dos efeitos prejudiciais que muitos dos compostos abordados possam ter, mais atenção na pesquisa para uma cura deve ser tida em conta com estes mesmos fármacos, pois destes também poderão advir múltiplos benefícios. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.7. Intervenções imunoterapêuticas direccionadas para a cura

O facto de uma possível reactivação das células de latência poder ser factível com a utilização de fármacos como os HDACi, a morte dos reservatórios virais ou mesmo das células infectadas activas, não está garantida, e portanto, o processo contínuo de replicação e morte celular, continuará a acontecer, mesmo com a administração de TARV. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Shan et al., 2012; Janet D Siliciano & Siliciano, 2014)

O HIV permite que células mesmo que não estejam infectadas entrem num processo de apoptose devido à exposição de receptores mortais na sua superfície. Isto é, proteínas, ou marcadores específicos que ficam dispostos na superfície das células (principalmente células T, mesmo sem que estas estejam infectadas), e apresentem como resultado, a morte celular. Apesar da TARV diminuir estes acontecimentos, em locais específicos como os nódulos linfáticos e tecidos linfáticos, isto continua a ocorrer, embora num nível reduzido comparativamente às pessoas que não fazem TARV. (CATIE, 2013; Hanauske-Abel et al., 2013)

A activação imunitária está associada a um aumento dos marcadores de inflamação o que por sua vez, origina um desenvolvimento mais rápido da doença e uma diminuição das células T CD4⁺. Este caso, observa-se mesmo ao nível dos controladores virais com uma virémia indetectável. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Assim, atacar esta activação imunitária poderá ser necessário garantir a remissão a longo-prazo da infecção de HIV. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Impulsionar as respostas imunitárias de forma a aumentar o reconhecimento do SI e de modo a que a eliminação as células produtoras de viriões seja possível, poderá ser um processo que se terá que passar no caminho para a erradicação viral. (Chun et al., 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

De forma a pôr em prática este ponto, investigações têm sido realizadas a nível da manipulação do SI de forma a obter uma cura funcional, que implica a obtenção de um

controlo da infecção, como no caso dos controladores elite ou nos controladores de pós-tratamento. Esta manipulação tem em vista a minimização dos reservatórios virais e a reparação do SI comprometido pela infecção. (Valadas, 2013)

Num estudo realizado em primatas infectados com o vírus da imunodeficiência do símios (VIS), observou-se que os animais conseguiram ser curados por uma vacina que induzia respostas das células T. Verificando-se, um enorme passo no sentido de uma possível cura. (J. D. Siliciano & Siliciano, 2014)

Estudos recentes em imunoterapia debruçam-se sobre a personalização da terapêutica. Uma das abordagens é feita a partir da extracção de células dendríticas de indivíduos HIV-positivos, e a junção destas com antígenos HIV provenientes dos mesmos indivíduos, sendo posteriormente administrada como vacina. O objectivo é induzir uma resposta imunitária potente capaz de atingir o HIV presente nas células de latência.

Esses estudos verificaram um atraso na recidiva aquando da interrupção da TARV após a administração desta terapêutica, mas os investigadores continuam em busca de um impacto na imunização do reservatório viral e na replicação viral residual nas pessoas HIV-positivas a fazer TARV. (Jefferys, 2014)

4.2.7.1. Antígeno morte programada 1 (PD1)

Os investigadores têm procurado o uso de vacinas que utilizam anticorpos específicos de modo a tentar desactivar estes receptores mortais nas células do sistema imunitário, aumentando a capacidade das células do SI de atacarem os agentes estranhos ao organismo (por exemplo: microrganismos e células tumorais), reconhecendo inclusivamente as células infectadas pelo vírus e por conseguinte, proceder à sua destruição. (CATIE, 2013; Katlama et al., 2013)

Com isto, surge a imunoterapêutica de modelação. Num estudo a decorrer em pessoas HIV-positivas e a fazer TARVc, são activados antígenos específicos das células T, como os antígenos morte programada 1 (PD1) e os seus ligandos PDL1, conseguindo assim activar e destruir as células de memória infectadas. (Jefferys, 2014; Lewin et al., 2014)

O antígeno PD1 está associado à activação das células T (principalmente às células infectadas com HIV), e a sua presença permanente na célula está relacionada com um tipo de disfunção celular, que leva à “exaustão” da célula. Este, envia sinais para a

célula, de modo a que esta interaja com outras moléculas existentes noutras células – como os seus ligandos. A formação de anticorpos, capazes de se ligar a esses antígenos e bloquear a acção dos ligandos, mostrou trazer vários benefícios em relação à replicação viral. No entanto, mais estudos são necessários para verificar a segurança deste método. (Jefferys, 2014; Katlama et al., 2013; Lewin et al., 2014)

O bloqueio das interacções entre o PD1 e o PDL1 em macacos infectados com VIS resultou numa expansão de células T CD8⁺ com uma melhoria na sua funcionalidade. Um aumento da sua sobrevivência, uma redução da carga viral e um atraso no aparecimento de recidivas após a interrupção da TARV também foram verificados. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Contudo, outros estudos indicaram que a expansão das respostas dadas pelas células T CD8⁺ através do bloqueio de PD1 não é suficiente para manter esse decréscimo de virémia. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

De qualquer forma o bloqueio deste antígeno, poderá demonstrar-se uma boa estratégia no ataque à infecção por HIV, quando utilizada como adjuvante de vacinação, contribuindo para a indução de respostas eficientes. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.7.2. Vectorização com Citomegalovírus

As vacinas analisadas até à data, não tiveram grande impacto nas terapêuticas actuais. No entanto, foi verificado que o citomegalovírus se apresenta como um bom vector para fornecimento de antígenos HIV, e é muito activo relativamente aos anticorpos neutralizantes, podendo assim potenciar a eliminação das células de latência infectadas. (Lewin et al., 2014)

A vacinação utilizando o vector de citomegalovírus (verificou respostas não convencionais nas células T CD8⁺) num grupo de macacos. Nestes, esta vectorização foi associada a um controlo da infecção e a uma clearance viral, apesar de uma profunda disseminação da virémia durante a infecção primária. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Assim, foi reportado um estudo em 99 macacos *rhesus* VIS-positivos, dos quais 50% foram vacinados com o vector da proteína expressa do *rhesus* citomegalovírus (RhCMV/SIV) e manifestaram um durável controlo avirémico com a estirpe patogénica SIVmac239. Após a disseminação hematológica e linfática do vírus, a replicação do mesmo permaneceu em locais específicos por semanas a meses. Contudo, com análises de métodos sensíveis, os macacos não tinham sinais da infecção,

não apresentavam vírus detectáveis no plasma ou tecidos, e a reactividade das células T ao VIS diminuiu. (Hansen et al., 2013)

Ensaio de PCR ou qRT-PCR, após vacinação, verificaram que durante 69-72 semanas, não foram detectados níveis de ARN ou ADN virais acima do limite base e a replicação competente do vírus não foi detectada nestes macacos em análises de co-cultura de tecidos ou por transferência de 60 milhões de células linfóides para macacos *rhesus* naïve. (Hansen et al., 2013)

Contudo, a partir do dia 77 da imunização, observou-se que esta não erradicou a infecção, mas a impossibilidade de encontrar mais ácidos nucleicos virais nos tecidos linfáticos, foi consistente com o facto da infecção poder ser contida na porta de entrada e a possibilidade de uma eventual erradicação viral. (Hansen et al., 2013)

A intercepção imunológica precoce logo na porta de entrada permitiu um controlo imunológico antes da irreversível propagação sistémica. (Hansen et al., 2013)

Foi demonstrado que este vector específico para as células T de memória, consegue diminuir a infecção produtiva de VIS e manter o controlo da imunidade com o tempo, sendo que uma possível cura funcional pode ser atingida. Com isto, uma vacina dirigida às células de memória T, sozinha ou combinada com anticorpos neutralizantes, poderá ter um importante significado num futuro próximo.

Todavia, há que ter em conta que o tamanho e o tipo do reservatório viral pode ser diferente na infecção em seres humanos, a fazer TARV iniciada somente durante a fase crónica da infecção. (Hansen et al., 2013)

Em suma, as vacinas com o vírus vector citomegalovírus, exploram a vulnerabilidade do VIS, com a sua capacidade de sustentar e manter a alta frequência de ligação às células T infectadas, nos sítios de replicação viral inicial. (Hansen et al., 2013)

4.2.7.3. VAC-3S

Uma outra análise efectuada com uma vacina de nome VAC-3S tem sido efectuada. Esta vacina, induz uma resposta específica à glicoproteína de superfície gp41 a partir de anticorpos que vão entrar em linha de conta, num mecanismo específico de depleção de células T CD4⁺, desenvolvendo protecção contra alguns efeitos patogénicos do HIV no sistema imunitário. Os investigadores pensam que esta poderá diminuir os processos de inflamação e também o reservatório viral. (Jefferys, 2014)

4.2.7.4. A utilização dos anticorpos monoclonais

Tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de estratégias terapêuticas de modo a eliminar completamente as células infectadas, ou de forma a atingir uma remissão virológica sustentável conseguida pelo SI do próprio indivíduo ou pela imunoterapia em estudo, após a descontinuação da TARV. (Chun et al., 2014; Shan et al., 2012)

Num estudo realizado por Berre e colaboradores em culturas celulares humanas, foi observado que quando primeiramente infectados, os macrófagos, recrutam o gene *gag* para compartimentos pré-existent, os MVB, contendo um receptor CD36, que acumula, armazena e liberta (após activação) os novos viriões, protegendo estas células do SI e da TARV. Quando silenciando este receptor, através de anticorpos anti-CD36, a libertação dos viriões HIV-1 dos macrófagos é inibida e consequentemente a transmissão do vírus para as células TCD4⁺ também. A expressão ectópica do CD36 em células HELA tornou-as susceptíveis a este anticorpo após a infecção destas por HIV. Foi assim demonstrado que o anticorpo monoclonal CD36 consegue inibir a libertação de novos viriões de HIV-1 do seu local de libertação celular, e portanto poderá prevenir a disseminação viral. (Berre et al., 2013)

Os macrófagos conseguem sobreviver infectados por HIV-1 durante meses e armazenar viriões por longos períodos de tempo, sendo indicados como potenciais reservatórios virais. (Berre et al., 2013)

Num estudo, realizado por Chu e colaboradores, demonstrou-se a presença de certos anticorpos monoclonais provenientes do organismo da pessoa infectada (designados anticorpos monoclonais neutralizantes), que conseguem eficientemente ligar-se a viriões provenientes das células de latência de indivíduos HIV-positivos, cujos níveis de virémia se encontravam eficazmente controlados pela TARV. (Chun et al., 2014; Collins, 2014)

Além disso, verificou-se que muitos desses anticorpos, conseguiram também bloquear a entrada do HIV isolado do reservatório viral de indivíduos infectados, em células T CD4⁺ derivadas de indivíduos não infectados pelo vírus. (Chun et al., 2014)

Da mesma forma, no mesmo estudo, foi também observado, que estes anticorpos tinham a capacidade de bloquear a replicação do HIV em simulação imunológica de células T CD4⁺ de pessoas infectadas. (Chun et al., 2014)

No entanto, para que estes anticorpos se desenvolvam no organismo do indivíduo infectado, são necessários pelo menos 6 meses de infecção por HIV, sendo que em alguns indivíduos (20%) estes só se desenvolvem passados 2 anos de infecção. Além disso, estes não são suficientes para controlar o vírus (não conseguindo proteger as pessoas de recidivas), e são caracterizados por um elevado grau de mutação, pelo que, a tarefa de formulação dos mesmos também não é facilmente conseguida. (Collins, 2014; Picker & Deeks, 2013)

Os anticorpos monoclonais neutralizantes (broadly Neutralising Antibodies - bNAbs), foram submetidos a estudos realizados por Barouch e colaboradores e Shingai e colaboradores em macacos infectados com VIS. (Barouch et al., 2013; Jefferys, 2014; Picker & Deeks, 2013)

Nestes animais foram administradas combinações de dois ou mais anticorpos monoclonais (pois verificou-se que combinações de anticorpos monoclonais que se ligam a múltiplos epítomos poderão ajudar a suprimir a replicação de HIV-1 em ratos imunizados), dirigidos a regiões estruturais específicas das células T CD4⁺. (Barouch et al., 2013; Picker & Deeks, 2013)

Foi verificada uma grande eficácia do anticorpo monoclonal neutralizante PGT121 em conjunto com outros anticorpos monoclonais quando administrado a macacos *rhesus* infectados pelo vírus VIS. Este estudo foi realizado em 18 animais que receberam o PGT121 isolado ou em conjunto com os anticorpos monoclonais e as respostas obtidas foram consequentes do nível inicial de carga viral apresentado por estes animais aquando do início da terapêutica. Assim destes 18, 17% com níveis de base de ARN <3,5log cópias/ml um controlo de longo-prazo foi obtido durante o período de seguimento, incluindo-se neste período a altura em que os anticorpos administrados baixaram para níveis indetectáveis. Estes continuam com níveis detectáveis de ADN pró-viral nos tecidos, apesar de em menor número. (Barouch et al., 2013)

Em 72% dos animais com níveis de base de ARN viral entre 3,5-5,3log cópias/ml a virémia foi rapidamente reduzida para níveis indetectáveis em 7 dias, mas após uma média de 56 dias apareceram recidivas, quando os níveis de anticorpos monoclonais no soro se reduziu para níveis indetectáveis. (Barouch et al., 2013; Jefferys, 2014; Picker & Deeks, 2013)

Em 11% dos animais que iniciaram a terapêutica de anticorpos monoclonais com altos valores de carga viral ARN >5,3log cópias/ml um controlo incompleto da virémia

plasmática e uma rápida recidiva foram verificados. Isto indica que existe um valor tecto para a eficácia desta terapêutica. (Barouch et al., 2013)

No geral, após a infusão destes anticorpos monoclonais foi verificado também um pequeno aumento na actividade dos anticorpos monoclonais neutralizantes específicos do vírus no hospedeiro, assim como, reduzida activação e melhoria na funcionalidade e na resposta das células T específicas do vírus. (Barouch et al., 2013; Jefferys, 2014; Picker & Deeks, 2013; Shan et al., 2012)

A questão que se coloca é: por que razão optar por esta terapêutica que tem que ser injectada em relação à TARV oral? (Picker & Deeks, 2013)

A resposta reside na diferença dos mecanismos envolvidos na supressão viral, das duas terapêuticas como se pode observar na Figura 8. Enquanto a TARV impede que outras células sejam infectadas (parte a da Figura 8), actuando em diversos sítios das células não infectadas inibindo a entrada do vírus nestas ou o mecanismo de actuação viral após a sua entrada a nível celular, esta contudo, não mata as células infectadas produtoras de viriões, nem facilita a *clearance* das partículas virais. Assim, é normal que quando descontinuada consigam haver recidivas. Além disso, as partículas virais podem

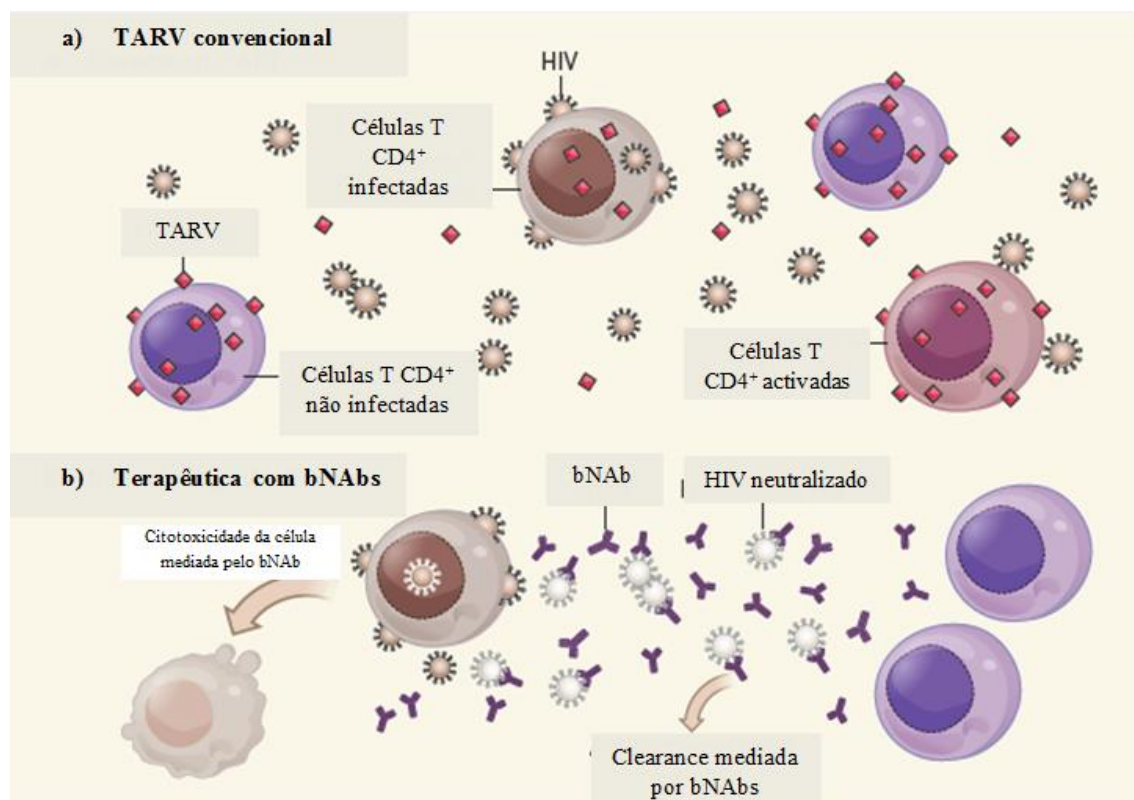


Figura 8: Diferenças entre a TARV e a terapêutica com bNAbs. Adaptado de (Picker & Deeks, 2013)

também activar células e contribuir para a inflamação característica da infecção por HIV. (Ling et al., 2014; Picker & Deeks, 2013)

Por outro lado, os anticorpos monoclonais neutralizantes, que se ligam às proteínas do involucro viral, neutralizam assim os vírus e impedem a propagação da infecção. Estes também podem acelerar a destruição das células produtoras de vírus por mecanismos dependentes de anticorpos, como a apoptose celular ou a fagocitose, podendo contribuir para a diminuição do reservatório viral e prevenir a activação imunitária (parte b da Figura 8). (Picker & Deeks, 2013)

A combinação dos anticorpos monoclonais neutralizantes particularmente o PGT121, o VRC01 e o VRC03, providenciou uma remissão virológica em células de latência de indivíduos que interromperam a TARV. Esta abordagem poderá revelar-se uma estratégia terapêutica dada a actividade potente destes anticorpos contra o HIV isolado destas células de latência, e a capacidade destes mesmos anticorpos terem um longo tempo de semi-vida (conferido por modificações bioquímicas). (Chun et al., 2014)

Através destes, torna-se possível que os indivíduos infectados consigam manter níveis baixos ou mesmo indetectáveis de virémia na ausência de TARV, com a administração não frequente destes anticorpos(dado o facto deles conseguirem ser mantidos no organismo por longos períodos de tempo). (Chun et al., 2014)

Assim, o tratamento da infecção viral começa a ganhar novos contornos, revelando-se mais fazível e podendo ser amplamente aplicada. (Chun et al., 2014; Ko et al., 2014)

Dois ensaios clínicos andam agora a decorrer de modo a utilizar estas infusões anticorpos monoclonais neutralizantes como substâncias de prevenção da aquisição da infecção e como factores que permitem a supressão do HIV nos indivíduos infectados *in vivo*. (Chun et al., 2014; Jefferys, 2014)

Apesar do que já se descobriu, ainda muito há a fazer, mas a esperança de um dia se utilizar uma terapêutica personalizada que deve provir do inicial isolamento do HIV obtido dos reservatórios virais de cada indivíduo infectado e a posterior identificação do anticorpo monoclonal HIV que manifesta a actividade supressiva mais potente contra esse específico isolado, é um processo que poderá vir a desenrolar-se no futuro. (Barouch et al., 2013; Chun et al., 2014)

4.2.7.5. O Interferão- α

O interferão- α suprime a replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (*in vitro*) através da introdução de mecanismos intrínsecos de restrição retrovirais a nível celular (já anteriormente falados). Foi verificado que o IFN- α quando administrado, induz a expressão factores de restrição supra fisiológica associados a um decréscimo pronunciado na virémia. (Abdel-Mohsen et al., 2014)

Este pode promover a desenvolvimentos que contribuem não só profilacticamente como também terapeuticamente e possivelmente numa estratégia de cura para a infecção de HIV. A indução o IFN- α pode ser o primeiro passo na defesa contra a infecção viral.

A descoberta que esta substância como fonte de terapêutica do HIV *in vitro*, foi feita precocemente, no entanto, só agora é que estudos recentes indicaram que a mesma pode suprimir o HIV *in vivo*. Além disto, esta forma de terapêutica, verificou-se estar associada a uma significativa redução do tamanho dos reservatórios celulares virais, podendo com isto, talvez se se alcançar uma erradicação viral. (Abdel-Mohsen et al., 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

O IFN- α está associado a ambos os efeitos: benefícios e prejudiciais. Isto é, sabe-se que o interferão- α induz vários mecanismos anti-retrovirais que suprimem a replicação viral, mas que por outro lado, podem resultar em baixos resultados em relação ao tratamento da doença em si, devido à activação celular e à inflamação provocada pelo mesmo. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Em conjunto, estas observações sugerem que o trabalho adicional precisa ser realizado para eliminar as vias moleculares de pró-inflamação associadas interferão- α e identificar os seus mecanismos anti-retrovirais. (Abdel-Mohsen et al., 2014)

O interferão- α endógeno está associado a uma rápida progressão da infecção e uma carga viral elevada. (Abdel-Mohsen et al., 2014)

Um estudo foi realizado com o sangue recolhido inicialmente de 15 indivíduos co-infectados com HIV e VHC(vírus da hepatite C), sem qualquer TARV e com carga viral detectável. Nestes, analisaram-se as células mononucleares do sangue periférico, antes, durante e após o tratamento com IFN- α administrado (exógeno). Tentou-se ainda verificar, se a relação inversa entre o IFN- α e a carga viral obtida dentro de um contexto de administração de IFN- α exógeno, poderia induzir genes anti-virais a níveis suprafisiológicos (os quais não se observam normalmente sem manipulação

farmacológica). Posteriormente, o mesmo tipo de células foi analisado, mas desta vez 12 indivíduos infectados apenas com HIV, igualmente sem TARV e carga viral detectável; e também em 12 indivíduos não infectados, de modo a comprar a influência da administração desta substância.

Os resultados desta investigação, demonstraram que vários factores de restrição, contribuem para o IFN- α suprimir o HIV-1 *in vivo*. (Abdel-Mohsen et al., 2014)

Este estudo providência a ideia de que um particular mecanismo imune intrínseco, pode constituir para uma futura estratégia anti-retroviral, complementando assim os estudos realizados anteriormente *in vitro*. (Abdel-Mohsen et al., 2014)

4.2.7.6. Citocinas

Melhoria da reconstituição imunitária com IL-7, é também acompanhada pelo um aumento consequente do número total de células T CD4⁺ que servem de reservatórios virais. Contudo, estas citoquinas poderão ter um efeito importante ao actuar como adjuvantes de vacinas. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Num estudo verificou-se que a IL-7 aumentou a virémia em 6 de 26 indivíduos a fazer TARV, e num outro estudo pôde observar-se que esta reactivou a replicação de HIV em células de indivíduos HIV-positivos, *in vitro*. Também induziu a proliferação das células T CD4⁺ que apresentavam o ADN pró-viral. Contudo, a capacidade para reactivar a replicação viral em modelos *ex vivo*, foi extremamente variável, estando agora a ser testada num estudo ERAMUNE 01, em que também é administrado raltegravir e maraviroc para prevenir a proliferação ou uma nova propagação do reservatório viral. (Katlama et al., 2013)

4.2.8. A citotoxicidade como estratégia

Neste estudo, foi verificado *in vivo* a eficiência de um agente citotóxico na morte de células infectadas com o vírus da imunodeficiência humana. Os investigadores analisaram inicialmente a influencia da TARV em órgãos específicos (medula óssea-fígado-timo) de ratos humanizados (um modelo válido para estudar a persistência do HIV, dado haver uma modificação genética para que o sistema imunitário destes animais se assemelhe ao dos seres humanos). E verificaram que este agente citotóxico é capaz de reduzir os níveis de ARN viral, mas não elimina a sua produção completamente. Posteriormente, eles utilizaram uma imunotoxina específica de HIV nestes órgãos e descobriram que comparativamente à TARV, esta substância consegue

eliminar especificamente as células infectadas activas, não tendo acção sequer sobre as não infectadas. Estes resultados, fornecem a prova que terapêuticas citotóxicas poderão ser componentes eficazes nas estratégias de erradicação do vírus, após a activação celular. (Denton et al., 2014)

Enquanto as estratégias de shock têm como intuito activar as células de latência, as estratégias "kill" não têm em conta a indução da activação destas células, mas sim e unicamente, a sua morte. Assim, candidatos à morte destas células, como as imunotoxinas, têm sido implementados de forma à obtenção da erradicação viral. As imunotoxinas são recombinantes ou estão bioquimicamente ligadas a proteínas bi-funcionais que combinam o domínio effector de uma proteína toxica com um anticorpo ou ligando específico. Aqui, a toxina utilizada foi a 3B3-PE38, (que combina a ligação à porção 3B3 scFv da gp120 do HIV-1 que tem como alvo a região conservada da célula T CD4+), com a exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38) que é o domínio effector. (Denton et al., 2014)

Esta terapêutica reduziu o número das células infectadas (activas) produtoras de ARN viral, para níveis mais baixos do que os atingidos apenas com TARV. (Denton et al., 2014)

Neste estudo foram utilizados 40 ratos humanizados a fazer TARV (TNF, emcitabina, e raltegravir), este regime de terapêutica foi escolhido devido às propriedades farmacodinâmicas, à maior eficácia em humanos, e a ter demonstrado eficácia em ratos humanizados, de forma a fazer uma reconstituição do SI humano após a infecção por HIV. O seu sangue periférico tinha uma média de 57% de células T CD45⁺ humanas, das quais 58% eram células T e destas 81% eram células T CD4⁺. (Denton et al., 2014)

Esta terapêutica elimina as células produtoras de ARN viral, e portanto a sua acção juntamente com TARV é mais rápida que quando a TARV é feita sozinha. (Denton et al., 2014)

4.2.9. Ciclopirox e Deferiprona

O HIV bloqueia a apoptose celular (como defesa das células contra a infecção viral), permanecendo nestas e formando os reservatórios celulares.

Contudo, dois agentes que interferem com a expressão dos genes virais responsáveis por esta manutenção do estado de latência foram estudados. O antifúngico tópico, ciclopirox e o agente quelante férrico deferiprona. (Hanuske-Abel et al., 2013)

O ciclopirox (CPX) e a deferiprona (DEF) inibem a proteína de hidroxilação pela acção das dioxigenases a concentrações alcançadas terapêuticamente. Esta inibição da hidroxilação do *inhibitors of the hydroxylation of eukaryotic translation initiation factor 5A* (eIF5A), é realizada pela deoxiepusine hidroxilase. O eIF5A é essencial no controlo da apoptose e na replicação do HIV-1. (Hanauske-Abel et al., 2013)

O CPX e a DEF ultrapassam a resistência induzida pelo retrovírus à apoptose e activam a morte celular na linhagem de células T CD4⁺ de latência infectadas pelo vírus. O mecanismo de apoptose está ligado directamente ao mecanismo mitocondrial. (Hanauske-Abel et al., 2013)

O colapso do potencial de membrana mitocondrial, dá origem à morte apoptótica e é relacionado com uma via intrínseca que leva à activação proteolítica das caspases iniciadoras e efectivas do fenómeno de apoptose celular. (Hanauske-Abel et al., 2013)

No estudo verificou-se os efeitos dos dois fármacos na apoptose das células H9 e nas células mononucleares do sangue periférico infectadas.

Foi utilizado um modelo de três fases para explicar a terapêutica de recuperação da aptidão apoptótica das células. (Hanauske-Abel et al., 2013)

Assim, na primeira fase, ocorre a diminuição da expressão dos genes do HIV (como o *tat*) e a consequente redução na produção de viriões. Por outro lado, ocorre um aumento da expressão de *vpr* activando a caspase-3. A fase 1 e fase 2 imitam os dois maiores efeitos numa resposta imunitária adaptativa, dado que existe um inicial bloqueio da infecção (que na resposta adaptativa do SI, utiliza anticorpos neutralizantes) e depois a eliminação das células infectadas (que o SI utiliza os linfócitos T citotóxicos). A fase 3 resulta depleção funcional da produção de viriões e na ausência de recidiva após o tratamento. (Hanauske-Abel et al., 2013)

No caso das células H9 analisadas, os fármacos aumentaram a despolarização da membrana mitocondrial iniciando um fenómeno de apoptose, evidenciando pela activação da caspase-3 e degradação do ADN viral como já anteriormente foi referido.

Nas células do sangue periférico, o ciclopirox baixou os níveis de ARN viral e de formação de proteínas virais ao limite de detecção. Nenhuma recidiva foi observada 12 semanas após a interrupção da terapêutica, sugerindo eliminação do reservatório viral.

Testes realizados em ratos (de forma a mimetizar o epitélio humano), e verificar a citotoxicidade do CPX, não detectaram qualquer dano ou activação de apoptose em

outras células que não as infectadas a concentrações que excediam a morte celular. (Hanauske-Abel et al., 2013)

Um novo alvo terapêutico relacionado com a inibição da hidroxilação proteica, pode assim pôr em vista dois fármacos (CPX e DEP) que actuam neste meio, devendo mais estudos ser efectuados de forma a alcançar optimizações químicas com o objectivo de obter anti-retrovirais citotóxicos selectivos. (Hanauske-Abel et al., 2013)

4.2.10. Intensificação de terapêutica

A contínua replicação viral com consequentes processos de inflamação, sempre foi vista como um problema que é característico da evolução da doença mesmo em indivíduos a fazer TARV e controladores virais, como já anteriormente foi referido. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013)

Mas como aparecem estas células que formam os reservatórios virais e de onde surge esta virémia residual que está presente mesmo nos controladores virais e em caso de TARV?

A explicação para o aparecimento das células de latência apresenta-se sobre dois modelos: a pré-activação de latência, que consiste na ideia de que o vírus consegue infectar directamente as células em repouso T CD4⁺, e o modelo de pós-activação que resulta na infecção das células T CD4⁺ activadas, no impedimento da sua morte celular e o posterior regresso ao estado de repouso onde se encontravam antes da activação. Quanto às causas prováveis da existência desta virémia residual, apresentam-se: as células de latência infectadas e que produzem viriões após reactivação; ou as células activadas cujos níveis de HIV se encontram altos e em replicação contínua devido à inexistente ou parcial supressão, obtida pela má penetração dos fármacos em certos locais da infecção. O GALT (tecido linfático associado ao intestino) é um exemplo de um desses locais. Apresentando-se como dos maiores sítios de replicação viral, onde grandes níveis de ADN de HIV-1 são encontrados nas células T CD4⁺ dos indivíduos infectados mesmo quando submetidos a TARV. (Katlama et al., 2013; Molina et al., 2014; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; J. D. Siliciano & Siliciano, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013; Van Lint et al., 2013)

Assim, a intensificação da terapêutica seria vista como um método eficiente para reduzir esta virémia residual. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013; R. F. Siliciano & Greene, 2011)

4.2.10.1. A intensificação com o Raltegravir

Certos estudos com este fármaco não obtiveram qualquer impacto sobre a virémia residual, activação imunitária ou reconstituição das células T CD4⁺. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Van Lint et al., 2013)

Contrariamente noutros estudos, efectuados por Buzon e colaboradores, identificaram-se níveis aumentados de círculos de 2 LTR (*long terminal repeat*) em 30% dos indivíduos a fazer TARVc, dentro de 2 a 4 semanas após intensificação, mas nenhuma redução na virémia foi observada e só em indivíduos com grandes valores de activação imunitária de base, é que estes resultados foram identificados. O aparecimento destes círculos deve-se à não integração do ADN pró-viral no genoma da célula hospedeira, que por sua vez, leva ligação a cada uma das extremidades das cadeias deste ADN, originando os 2 círculos de material genético referidos. (Katlama et al., 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013; Stevenson, 2013; Van Lint et al., 2013)

É possível que as diferentes características dos doentes, os regimes terapêuticos de base e o tempo a que a intensificação que ocorreu em cada estudo, possam compreender as discrepâncias obtidas nos diferentes estudos. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Um aspecto importante a referir é que TARV de base no estudo de Buzon foi feita com IPs, bem como noutro estudo que verificou o aumento destes círculos.

A intensificação da terapêutica com raltegravir não mostrou impacto na carga viral no líquido cefalorraquidiano, ou no HIV isolado do sêmen. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.10.2. A intensificação com Maraviroc

A intensificação da terapêutica com o fármaco maraviroc, também não teve impacto na virémia residual ou nos reservatórios de HIV. Contudo, a activação celular sanguínea e na mucosa rectal aumentou, indicando que este pode promover à replicação viral. (Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

Apesar de alguns efeitos positivos demonstrados na intensificação da terapêutica, a sua potência na erradicação viral parece limitada. Pelo que, mais estratégias para eliminação dos reservatórios virais são necessárias. (Katlama et al., 2013; Passaes & Sáez-Cirión, 2014)

4.2.10.3. Considerações gerais na intensificação da terapêutica

Todos os estudos realizados na intensificação da terapêutica revelaram que não houve efeito significativo na virémia residual. Além disso, esta também revelou falhar na redução dos níveis de ARN viral no líquido cefalorraquidiano. (Katlama et al., 2013; Janet D Siliciano & Siliciano, 2013; Stevenson, 2013)

4.2.11. A utilização de do Δ^9 -tetrahydrocannabinol

Estudos anteriores em macacos *rhesus* infectados com VIS, demonstraram que o Δ^9 -tetrahydrocannabinol atrasa a progressão da doença e diminui a morbidade e mortalidade. Vários órgãos são afectados por este composto (o SI, o tracto gastrointestinal e o SNC) Para além disso, esta substância consegue activar várias células e mecanismos de acção que contribuem em geral para uma resposta sistémica à infecção e à progressão da doença, incluindo-se nestas a entrada do vírus nas células a sua integração, a replicação viral e a inflamação tecidular. (Molina et al., 2014)

A presença de receptores de canabinóides no plexo mientérico e submucosal do tracto gastrointestinal revela que estas substâncias poderão ter um papel importante na modelação das respostas gastrointestinais à infecção. O receptor canabinóide de tipo 2 está associado a fenómenos anti-inflamatórios no tracto gastrointestinal. Assim, aumenta a possibilidade destas substâncias poderem ter influência na modelação da flora e tecido linfático associado ao intestino. Desta forma, os tetrahydrocannabinóides poderão conferir protecção contra a inflamação nos animais infectados com VIS, reduzindo a lesão tecidular associada ao aumento da replicação viral nos tecidos linfáticos associados ao intestino. (Molina et al., 2014)

Num estudo em que amostras duodenais foram retiradas após 5 meses do tratamento, foi provado que a administração de Δ^9 -tetrahydrocannabinol, por via intra-muscular, durante 17 meses, resulta numa geral atenuação da carga viral e da inflamação tecidular em macacos *rhesus* infectados com VIS (n=8, em que 4 foram submetidos ao composto e os outros 4 serviram de controlo). Sabe-se que os tecidos linfáticos associados ao intestino (GALT) são um sítio importante de replicação viral e inflamação, tendo impacto na progressão da doença de HIV e VIS. (Molina et al., 2014)

O estudo demonstrou que o Δ^9 -tetrahydrocannabinol atenuou a circulação de células T CD8⁺ com co-receptor CXCR4 e diminuiu as células T CD8⁺ com co-receptor CCR5

(que parecem estar implicadas no processo de inflamação) no duodeno. Diminuíram a carga viral no intestino e promoveram a uma alteração significativa na expressão das citocinas, aumentado a célula *T-helper2*. E foi verificado um efeito anti-apoptótico e, possivelmente, anti-proliferativo ou regenerativo em geral sobre os tecidos do intestino. Através deste estudo, foi possível verificar de estas substâncias poderão influenciar a progressão da doença, diminuindo a morbilidade e até mortalidade característica da mesma. (Molina et al., 2014)

4.2.12. Fármacos de actuação no SNC

O SNC apresenta uma complexidade acrescida na tentativa de cura de HIV devido à incapacidade de acesso de certos fármacos e à impossibilidade de análise eficiente dos resultados provenientes, assim como na obtenção de amostras deste local. (Garrido & Margolis, 2014; Kelly et al., 2013; Ruelas & Greene, 2013; Van Lint et al., 2013)

Existem três formas diferentes para avaliar a infecção por HIV no SNC e estas passam por: detecção de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano, testes neurocognitivos e técnicas de imagiologia. (Garrido & Margolis, 2014)

Como a obtenção de amostras do líquido cefalorraquidiano é uma técnica invasiva, não pode ser realizada frequentemente, pelo que outros métodos não invasivos são desejáveis para avaliação. (Garrido & Margolis, 2014)

Nos biomarcadores incluem-se a carga de ARN viral, os níveis de neopterin, os níveis da proteína tau e seus precursores, produtos da proteína amiloide, entre outros; nos testes neurocognitivos incluem-se exames psicomotores, coordenação olho-mão, capacidade de registar e relembrar memórias, linguagem, resolução de problemas, etc.; nas técnicas que neuro-imagem apresenta-se a ressonância magnética espectroscópica, imagem de ressonância magnética funcional, entre outros. (Garrido & Margolis, 2014)

A barreira hemato-encefálica vai seleccionar a entrada de várias moléculas de carácter farmacológico no SNC, funcionando em certa parte como um potencial local de reserva viral. (Garrido & Margolis, 2014; Kelly et al., 2013)

A capacidade de penetração pelos fármacos anti-retrovirais nesta barreira vai diferir de acordo com a sua lipofilicidade. Variando entre 1 a 4 (sendo estes valores, de baixa penetração a alta penetração da barreira hemato-encefálica, respectivamente) e relacionando-se com o nível de virémia no líquido cefalorraquidiano e a disfunção neurocognitiva. Todavia, devido às limitações na recolha de amostras cerebrais, a

quantidade viral medida só consegue ser eficientemente feita após autópsia, podendo estes valores diferir do dos obtidos no líquido cefalorraquidiano. (Garrido & Margolis, 2014)

Com melhorias na penetração dos fármacos e na sua biodisponibilidade, provavelmente reduções na infecção persistente e no estabelecimento dos reservatórios poderão ser observados. (Garrido & Margolis, 2014)

Uns fármacos que têm sido estudados ao nível do SNC são os antagonistas do co-receptor CCR5 que poderão funcionar como atenuadores do processo inflamatório e limitar a replicação viral. Assim, 6 macacos infectados com VIS foram tratados com maraviroc por 5 meses, após 24 dias da inoculação viral em regime de monoterapia e os outros 22 também infectados, serviram apenas de controlo (não lhes tendo sido administrada qualquer TARV). (Kelly et al., 2013)

O maraviroc (fármaco utilizado), apresentou uma grande penetração no SNC e efeitos neurotóxicos mínimos. (Kelly et al., 2013)

Nestes, o ARN viral e o ADN pró-viral no cérebro foram observados em níveis muito mais baixos no tratamento, e uma redução da replicação no SNC de VIS também foi observada. Com isto, supõe-se que o fármaco poderá talvez reduzir também o reservatório viral. O tratamento também permitiu fazer decair os níveis de monócitos e macrófagos activados. Com este tratamento, também o precursor da proteína amilóide axonal foi diminuído, para níveis idênticos aos dos animais não infectados, garantindo maior protecção. Quanto ao CCL2 (mediador da inflamação), a redução dos seus níveis, diminuiram consequentemente a passagem dos monócitos através da barreira hematoencefálica, diminuindo por sua vez o processo inflamatório. (Kelly et al., 2013)

Com este estudo, foi possível referir que a inibição do co-receptor CCR5 pôde prevenir assim as enfermidades neurológicas associadas à infecção, reduzindo a inflamação provocada e limitando a replicação viral. (Kelly et al., 2013)

Este fármaco associado a outros anti-retrovirais, poderão oferecer múltiplos benefícios neuro-protectores, pelo que mais estudos poderão ser promissores neste campo. (Kelly et al., 2013)

Uma outra estratégia para alcançar uma maior penetração no SNC, inclui a utilização de nanopartículas. Como as *Gold nanoparticles* (AuNPs), que apresentam baixa toxicidade em linfócitos, macrófagos e células microendoteliais. Com um tamanho médio de 2 nm, inertes e multivalentes, revelam-se compostos interessantes para a distribuição de

fármacos. Já foram demonstrados resultados da passagem destas partículas através da barreira hemato-encefálica com posterior localização no parênquima cerebral de ratos. (Garrido & Margolis, 2014)

4.2.13. O MCPIP1

O *monocyte chemotactic protein-induced protein 1* (MCPIP1) é um regulador da resposta inflamatória e da homeostase imunitária, que limita a infecção por HIV-1 em vários passos do ciclo viral, principalmente ao nível das células T CD4⁺. Este pertence à família das nucleases dos dedos de zinco de 4 proteínas MCPIP1-4 ou 12A-D, cuja expressão é muito alta nos tecidos imunitários. (Liu et al., 2013)

Alguns investigadores afirmam que este composto actua como uma RNase degradando o ARNm viral nas células de latência. (Liu et al., 2013)

Quando em repouso, as células apresentam este factor MCPIP 1, também designado por Zc3h12a ou regnase-1. Por sua vez, com a replicação viral, ou a activação celular consequente, ocorre o silenciamento deste factor com a rápida degradação do mesmo.

Uma diminuição no factor MCPIP1, resulta num enorme fenómeno inflamatório em ratos. (Liu et al., 2013)

A inibição do HIV-1 por MCPIP1 é mediada não pelos factores virais, mas sim pela activação celular. Um estudo em ratos KO (*knocked out*), verificaram que MCPIP1 era rapidamente degradado nas células T activadas por uma paracaspase MALT1(*mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1*), que activa linfócitos B e T. (Liu et al., 2013)

A perda doMCPIP1 é provável contribuir para o desenrolar da infecção por HIV-1, contribuindo assim para o desenvolvimento de Sida. Este estudo poderá contribuir para o estudo de novos métodos que interfiram com a imunodeficiência provocada pelo vírus HIV-1, nos indivíduos infectados. (Liu et al., 2013)

Capítulo 5 – O envolvimento da ética

Quanto do reservatório viral vai ser eliminado a partir dos agentes reversores do estado de latência celular?

E o que acontecerá às células depois de activadas?

“Apesar de alguns investigadores afirmarem que essas células serão destruídas ou pelo vírus ou pelo sistema imunitário do hospedeiro, limpando assim a presença do vírus, dados recentes indicam que isso pode não ser bem verdade.” (CATIE, 2013)

Segundo Steven Deeks, um investigador de São-Francisco, refere: "como devemos nós balancear as preocupações éticas de administrar medicamentos potencialmente tóxicos a pessoas HIV-positivas mas as quais se encontram estáveis e portanto de "boa" saúde? A população ideal para estes estudos são aqueles que tiveram a fazer correctamente a terapêutica de longo prazo, mas este apenas parece ser o grupo que menos precisa da cura." (CATIE, 2013)

Adicionalmente a outra questão que se coloca é a interrupção da TARV em indivíduos que estão a ter sucesso com a utilização da mesma, para verificação da reactivação viral. (Katlama et al., 2013)

Estes factores podem ter repercussões dando origem a morbilidades com aparecimento de recidivas, ou mesmo outras enfermidades, ou até à mortalidade. Assim, há que pesar os benefícios e danos (análise benefício-risco) destas intervenções, observando por exclusão de partes, o que poderá ajudar o indivíduo em particular, e logrará com respostas que se podem expandir à sociedade em geral. (Lewin, 2014a)

A necessidade de cura continua a estar presente, e os estudos para a mesma não se podem basear unicamente em modelos *in vitro* ou de utilização de animais, pois o organismo humano, por muito que se assemelhe ao dos animais (com as várias modificações genéticas que fazem nos mesmos), este continua a apresentar diferenças fisiológicas. Assim, continua a ser imprescindível a utilização de indivíduos infectados, mesmo que com carga viral suprimida, para que respostas consigam ser obtidas sobre os novos fármacos em estudo.

Além disso, antes de qualquer utilização em seres humanos, os compostos passam por imensos estudos, sendo unicamente administrados quando se espera uma toxicidade mínima e eficácia terapêutica. Visto isto, apesar das questões éticas serem apropriadas, a cura continua por atingir e só com mais estudos em humanos é que uma resposta benéfica a esta infecção se consegue obter.

Capítulo 6 - Conclusão

A cura da infecção por HIV deve ser efectiva, segura, simples e alcançável a todo o público alvo. (A. Fauci et al., 2014)

Apesar dos anos passarem nenhum estudo conseguiu ainda espelhar o resultado de Timothy Brown (o doente de Berlim). Todavia, existe esperança que a situação se modifique e um estudo consiga obter um resultado idêntico, num futuro não muito distante. (Jefferys, 2014)

O largo desenvolvimento de intervenções capazes de levar à cura continuam sem uma solução eminente. A junção de esforços científicos e da comunidade, continuam a ser essenciais para estimular estes estudos e garantir o financiamento e apoio crescente. De forma a reforçar a compreensão da ciência junto da comunidade infectada pelo HIV e público em geral, são necessárias colaborações constantes entre cientistas, epidemiologistas, clínicos e investigadores de saúde pública e social. (Barré-Sinoussi et al., 2013; Jefferys, 2014)

Desde as estratégias de “shock and kill”, passando pelo aumentando a susceptibilidade à apoptose das células infectadas por HIV, várias foram as estratégias para eliminar reservatórios virais. (Shan et al., 2012)

Apesar de ainda haver um longo caminho a percorrer no sentido da cura, um maior conhecimento sobre as estratégias para a conseguir, reflectindo sobre os reservatórios virais em si, será necessário. Só desta forma, um caminho para reduzir ou mesmo erradicar estas células de latência poderá ser construído. (Qian et al., 2014; Van Lint et al., 2013)

Os desafios envolvidos nos campo da cura reflectem as questões éticas baseadas a toxicidade dos fármacos, (que podem não trazer benefício para a saúde dos indivíduos com carga viral suprimida através da TARV corrente); a falta de ensaios para monitorização dos efeitos dos tratamentos nos reservatórios HIV *in vivo*; e inclusivamente a falta de métodos para quantificação destas células em estado de latência. (Eriksson et al., 2013; Teófilo, 2013a)

Mas como diz o filósofo chinês Lau-tzu: “Uma viagem de muitos quilómetros começa com um único passo”...

Bibliografia

Abdel-Mohsen, M., Deng, X., Liegler, T., Guatelli, J. C., Salama, M. S., Ghanem, H. E. a, & Pillai, S. K. (2014). Effects of alpha interferon treatment on intrinsic anti-HIV-1 immunity in vivo. *Journal of Virology*, 88(1), 763–7. doi:10.1128/JVI.02687-13

Antunes, F. (2011). Estratégias e progressos na terapêutica anti-retrovírica. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª Edição., pp. 287–296). Lisboa: Permanyer Portugal.

Azevedo-Pereira, J. M. (2011). Ciclo biológico de VIH. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª edição., pp. 13–30). Lisboa.

Barouch, D. H., Whitney, J. B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T. Y., Liu, J., & Burton, D. R. (2013). Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature*, 503(7475), 224–8. doi:10.1038/nature12744

Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L., & Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(12), 877–83. doi:10.1038/nrmicro3132

Berre, S., Gaudin, R., Cunha de Alencar, B., Desdouits, M., Chabaud, M., Naffakh, N., & Benaroch, P. (2013). CD36-specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2523–38. doi:10.1084/jem.20130566

Bruce, J. W., Reddington, R., Mathieu, E., Bracken, M., Young, J. a T., & Ahlquist, P. (2013). ZASC1 stimulates HIV-1 transcription elongation by recruiting P-TEFb and TAT to the LTR promoter. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003712. doi:10.1371/journal.ppat.1003712

Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., & Lichterfeld, M. (2014). Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *Journal of Virology*, 88(17), 10056–65. doi:10.1128/JVI.01046-14

Caldeira, L. (2010). Infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana. In P. Ponce (Ed.), *Manual de Terapêutica Médica* (1ª ed., pp. 975–986). Lisboa: Lidel- Edições Técnicas, Lda.

Camacho, R. (2011). Resistência aos anti-retrovíricos Patogénese, monitorização laboratorial e impacto na clínica do infectado por VIH. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª ed., pp. 411–424). Lisboa: Permanyer Portugal.

CATIE. (2013). HIV CURE RESEARCH. *TreatmentUpdate* 196, 25(2), 1–16. doi:1181-7186

Chun, T.-W., Murray, D., Justement, J. S., Blazkova, J., Hallahan, C. W., Fankuchen, O., & Fauci, A. S. (2014). Broadly neutralizing antibodies suppress HIV in the persistent viral reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 184, 1–6. doi:10.1073/pnas.1414148111

Chun, T.-W., Shawn Justement, J., Murray, D., Kim, C. J., Blazkova, J., Hallahan, C. W., & Fauci, A. S. (2013). Effect of antiretroviral therapy on HIV reservoirs in elite controllers. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(9), 1443–7. doi:10.1093/infdis/jit306

Cohen, J. (2014). Cure setbacks force HIV researchers to reset sights. *SCIENCE*, 345(6196), 495–496. Retrieved from www.sciencemag.org

Collins, S. (2014). HIV Treatment+Bulletin (e). In S. Collins (Ed.), *Cure research at AIDS 2014: TILDA measures the reservoir and romidepsin wakes it up* (Vol. 15, pp. 10–11). UK: HIV i-Base. Retrieved from <http://i-base.info/htb/wp-content/uploads/2014/08/HTB-JulAug-2014e.pdf>

Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica. (2013). *Medicamentos ARV para o tratamento da infeção por vírus da imunodeficiência humana*. FNM. Retrieved September 10, from http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE_O_INFARMED/ESTRUTURA_E_ORGANIZACAO/CTE/Comissao_Nacional_de_Farmacia_Terapeutica/FNM/FNM_VI_H_final.pdf

Denton, P. W., Long, J. M., Wietgreffe, S. W., Sykes, C., Spagnuolo, R. A., Snyder, O. D., & Garcia, J. V. (2014). Targeted cytotoxic therapy kills persisting HIV infected cells during ART. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003872. doi:10.1371/journal.ppat.1003872

Doroana, M. (2011a). Análogos nucleósidos inibidores da transcriptase reversa. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4^a ed., pp. 323–336). Lisboa: Permanyer Portugal.

Doroana, M. (2011b). Inibidores da integrase. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4^a ed., pp. 393–396). Lisboa: Permanyer Portugal.

Doroana, M. (2011c). Inibidores de entrada. In F. Antunes (Ed.), *Manual de Terapêutica Médica* (4^a ed., pp. 381–392). Lisboa: Permanyer Portugal.

Douek. (2013). Immune Activation , HIV Persistence , and the Cure. *Topics in Antiviral Medicine*, 21(4), 128–132.

Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. a, Lysenko, E. S., & Siliciano, J. D. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174

Espada de Sousa, A., & Victorino, R. (2011). Imunopatogénese e Resposta Imunitária. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4^a Edição., pp. 55–76). Lisboa: Permanyer Portugal.

Fauci, A., Marston, H., & Folkers, G. (2014). An HIV cure: feasibility, discovery, and implementation. *JAMA*, 312(4), 9–10. Retrieved from <http://jama.jamanetwork.com/>

Fauci, A. S. (2014). *At AIDS 2014, Dr. Anthony S. Fauci Discusses Key Challenges in HIV Scientific Discovery: Cure, Vaccine*. NIH news releases. Retrieved September 27, 2014, from <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2014/Pages/FauciAIDS2014.aspx>

FDA. (2014). *HIV/AIDS Historical Time Line 1981-1990. For Patients and Patient Advocates*. Retrieved September 09, 2014, from <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm151074.htm>

Foxall, R. (2013). The elite controllers FU programme. In *Progressos na direção da cura no VIH e hepatites : compreendendo um quadro de mudança* (p. 11). Lisboa.

Garrido, C., & Margolis, D. M. (2014). Translational challenges in targeting latent HIV infection and the CNS reservoir problem. *Journal of Neurovirology*, 5–9. doi:10.1007/s13365-014-0269-z

Goldberg, D. E., Siliciano, R. F., & Jr., W. R. J. (2012). Outwitting Evolution: Fighting Drug Resistance in the Treatment of TB, Malaria and HIV. *NIH*, 148(6), 1271–1283. doi:10.1016/j.cell.2012.02.021

Gomes, C. (2013, November 27). Portugal é o terceiro país europeu com maior taxa de novos casos de sida. *Público*. Retrieved from <http://www.publico.pt/n1614132>

Gu, W.-G., & Chen, X.-Q. (2014). Targeting CCR5 for anti-HIV research. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. doi:10.1007/s10096-014-2173-0

Hammer, S. M. (2013). Baby steps on the road to HIV eradication. *The New England Journal of Medicine*, 369(19), 1855–7. doi:10.1056/NEJMe1309006

Hanauske-Abel, H. M., Saxena, D., Palumbo, P. E., Hanauske, A.-R., Luchessi, A. D., Cambiaghi, T. D., & Mathews, M. B. (2013). Drug-induced reactivation of apoptosis abrogates HIV-1 infection. *PloS One*, 8(9), e74414. doi:10.1371/journal.pone.0074414

Hansen, S. G., Piatak, M., Ventura, A. B., Hughes, C. M., Gilbride, R. M., Ford, J. C., & Picker, L. J. (2013). Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature*, 502(7469), 100–4. doi:10.1038/nature12519

Hatano, H., Yukl, S. a, Ferre, A. L., Graf, E. H., Somsouk, M., Sinclair, E., & Deeks, S. G. (2013). Prospective antiretroviral treatment of asymptomatic, HIV-1 infected controllers. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003691. doi:10.1371/journal.ppat.1003691

Highleyman, L. (2014). *AIDS 2014: Romidepsin Activates Latent HIV, But Does Not Decrease Viral Reservoir*. Search for a Cure. Retrieved September 21, 2014, from <http://www.hivandhepatitis.com/hiv-treatment/hiv-cure/4760-aids-2014-romidepsin-activates-latent-hiv-but-does-not-decrease-viral-reservoir>

Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I. S., & Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540–51. doi:10.1016/j.cell.2013.09.020

Hope, T. J. (2013). Marking the 30th anniversary of the first journal in our field. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29(11), 1397. doi:10.1089/aid.2013.1501

Jefferys, R. (2014). *Research toward a cure and immune-based and gene therapies. HIV TREATMENT BULLETIN*. Retrieved September 17, 2014, from <http://i-base.info/htb/26957>

Jefferys, R., Voronin, Y., Dumiak, M., & McEnery, R. (2014). CROI: Progress on Prevention and Cure. *IAVIREPORT- The Publication on AIDS Vaccine Research*, 18(1), 1–20. Retrieved from WWW.IAVIREPORT.ORG

Katlama, C., Deeks, S. G., Autran, B., Martinez-Picado, J., van Lunzen, J., Rouzioux, C., & Sekaly, R. P. (2013). Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. *Lancet*, 381(9883), 2109–17. doi:10.1016/S0140-6736(13)60104-X

Kelly, K. M., Beck, S. E., Metcalf, K. A., Queen, S. E., Dorsey, J. L., Adams, R. J., & Mankowski, J. L. (2013). Neuroprotective maraviroc monotherapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques: reduced replicating and latent SIV in the brain. *AIDS*, 27(18), 21–28. doi:10.1097/QAD.0000000000000074

Ko, S.-Y., Pegu, A., Rudicell, R. S., Yang, Z., Joyce, M. G., Chen, X., & Nabel, G. J. (2014). Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature*. doi:10.1038/nature13612

Lafeuillade, A., Wainberg, M., Gougeon, M.-L., Loes, S. K., Halfon, P., & Tissot-Dupont, H. (2014). Highlights from the 2014 International Symposium on HIV & Emerging Infectious Diseases (ISHEID): from cART management to the end of the HIV pandemic. *AIDS Research and Therapy*, 11, 28. doi:10.1186/1742-6405-11-28

Laird, G. M., Eisele, E. E., Rabi, S. A., Lai, J., Chioma, S., Blankson, J. N., & Siliciano, R. F. (2013). Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003398. doi:10.1371/journal.ppat.1003398

Lewin, S. R. (2014a). A cure for HIV: where we've been, and where we're headed. *NIH Public Access*, 381(9883), 2057–2058. doi:10.1016/S0140-6736(13)61180-0.A

Lewin, S. R. (2014b). Finding a cure for HIV: much work to do. *Annals of Internal Medicine*, 161(5), 368–9. doi:10.7326/M14-1573

Lewin, S. R., Deeks, S. G., & Barré-Sinoussi, F. (2014). Towards a cure for HIV--are we making progress? *Lancet*, 384(9939), 209–11. doi:10.1016/S0140-6736(14)61181-8

Ling, B., Piatak, M., Rogers, L., Johnson, A.-M., Russell-Lodrigue, K., Hazuda, D. J., & Veazey, R. S. (2014). Effects of treatment with suppressive combination antiretroviral drug therapy and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide

hydroxamic acid; (SAHA) on SIV-infected Chinese rhesus macaques. *PloS One*, 9(7), e102795. doi:10.1371/journal.pone.0102795

Liu, S., Qiu, C., Miao, R., Zhou, J., Lee, A., Liu, B., & Wang, T. (2013). MCP1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 19083–8. doi:10.1073/pnas.1316208110

Madec, Y., Boufassa, F., Porter, K., Prins, M., Sabin, C., d'Arminio Monforte, A., & Meyer, L. (2013). Natural history of HIV-control since seroconversion. *AIDS (London, England)*, 27(15), 2451–60. doi:10.1097/01.aids.0000431945.72365.01

Manjunath, N., Yi, G., Dang, Y., & Shankar, P. (2013). Newer gene editing technologies toward HIV gene therapy. *Viruses*, 5(11), 2748–66. doi:10.3390/v5112748

Martins, H. C. (2011). Distribuição mundial dos genótipos (epidemiologia molecular de VIH). In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª edição., pp. 87–92). Lisboa: Permanyer Portugal.

McIntyre, J., Moral, M. A., & Bozzo, J. (2007). Combination therapy with valproic acid in cancer: Initial clinical approach. *Drugs of the Future*, 32(1), 45. doi:10.1358/dof.2007.032.01.1052960

Medicinenet.com. (2012). *Definition of Cure. Cure definition*. Retrieved September 15, 1BC, from <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=31243>

Molina, P. E., Amedee, A. M., Lecapitaine, N. J., Zabaleta, J., Mohan, M., Winsauer, P. J., & Birke, L. L. (2014). Modulation of Gut-Specific Mechanisms by Chronic D - Tetrahydrocannabinol Administration in Male Rhesus Macaques Infected with Simian Immunodeficiency Virus :, 30(6), 567–578. doi:10.1089/aid.2013.0182

Munier, M. L., & Kelleher, a D. (2007). Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunology and Cell Biology*, 85(1), 6–15. doi:10.1038/sj.icb.7100015

NIH. (2009). *HIV/AIDS. How HIV causes AIDS*. Retrieved August 26, 1BC, from <http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/howhivcausesaids/pages/howhiv.aspx>

Oxford Dictionaries. (n.d.). *Definition of Cure*. Retrieved September 15, 1BC, from <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/cure#cur%EF%BF%BD>

Passaes, C. P., & Sáez-Cirión, A. (2014). HIV cure research: advances and prospects. *Virology*, 454-455, 340–52. doi:10.1016/j.virol.2014.02.021

Pedro, M. (2011). Testes serológicos e víricos. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª edição., pp. 117–127). Lisboa: Permanyer Portugal.

Persaud, D., Gay, H., Ziemniak, C., Chen, Y. H., Piatak, M., Ph, D., & Strain, M. (2013). Absence of Detectable HIV-1 Viremia after Treatment Cessation in an Infant. *The New England Journal Of Medicine*, 1–8. doi:10.1056/NEJMoa1302976

Picker, L. J., & Deeks, S. G. (2013). HIV: Antibodies advance the search for a cure. *Nature*, 503(7475), 207–8. doi:10.1038/nature12703

Priberam Dicionário. (n.d.). *Significado de cura*. Retrieved September 15, 1BC, from <http://www.priberam.pt/dlpo/cura>

Qian, Y. Q., Ming, S. Y., & Ying, M. L. (2014). Research Highlight HIV Cure and HIV Reservoirs. *Biomed Environ Sci*, 27(6), 478–480. doi:10.3967/bes2014.078

Qu, X., Wang, P., Ding, D., Wang, X., & Zhang, G. (2014). Zinc finger nuclease : a new approach for excising HIV-1 proviral DNA from infected human T cells. *Mol Biol*, 41, 5819–5827. doi:10.1007/s11033-014-3456-3

Rabi, S. A., Laird, G. M., Durand, C. M., Laskey, S., Shan, L., Bailey, J. R., & Siliciano, R. F. (2013). Multi-step inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3704. doi:10.1172/JCI67399.3848

Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Winckelmann, A., Østergaard, L., Søgaaard, O. S., Lewin, S., & McMahon, D. (2013a). Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies Advancing to clinical trials. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(4), 790–799.

Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Winckelmann, A., Østergaard, L., Søgaaard, O. S., Lewin, S., & McMahon, D. (2013b). Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies Advancing to clinical trials. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(4), 790–799. Retrieved from www.landesbioscience.com

Rathbun, R. C. (2014a). *Chemokine Receptor Antagonists*. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection*. Retrieved September 10, 1BC, from <http://emedicine.medscape.com/article/1533218-overview#aw2aab6b9>

Rathbun, R. C. (2014b). *Fusion Inhibitors*. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection*. Retrieved September 10, 1BC, from <http://emedicine.medscape.com/article/1533218-overview#aw2aab6b8>

Rathbun, R. C. (2014c). *Integrase Inhibitors*. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection*. Retrieved September 10, 1BC, from <http://emedicine.medscape.com/article/1533218-overview#aw2aab6b7>

Rathbun, R. C. (2014d, August 29). *Table of FDA-Approved Antivirals and Regimens*. *Antiretroviral Therapy for HIV Infection*. Retrieved September 09, 1BC, from <http://emedicine.medscape.com/article/1533218-overview#aw2aab6b3>

ROCHE. (2005). *A SIDA em Portugal. Estatísticas e Números*. Retrieved August 28, 1BC, from <http://www.roche.pt/sida/estatisticas/portugal.cfm>

- Rosenbloom, D. I. S., Hill, A. L., Rabi, S. A., Siliciano, R. F., & Nowak, M. A. (2013). Antiretroviral dynamics determines HIV evolution and predicts therapy outcome. *NIH*, 18(9), 1378–1385. doi:10.1038/nm.2892.
- Ruelas, D. S., & Greene, W. C. (2013). An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, 155(3), 519–29. doi:10.1016/j.cell.2013.09.044
- Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., & Rouzioux, C. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003211. doi:10.1371/journal.ppat.1003211
- Sampah, M. E. S., Shen, L., Jilek, B. L., & Siliciano, R. F. (2013). Dose – response curve slope is a missing dimension in the analysis of HIV-1 drug resistance. *PNAS*, 108(18), 7613–7618. doi:10.1073/pnas.1018360108
- Shan, L., Deng, K., Shroff, N. S., Durand, C. M., Rabi, S. A., Yang, H.-C., & Siliciano, R. F. (2012). Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*, 36(3), 491–501. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.014
- Shen, L., Rabi, S. A., Sedaghat, A. R., Shan, L., Lai, J., Xing, S., & Siliciano, R. F. (2011). A critical subset model provides a conceptual basis for the high antiviral activity of major HIV drugs. *Science Translational Medicine*, 3(91), 91ra63. doi:10.1126/scitranslmed.3002304
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2013). Recent trends in HIV-1 drug resistance. *Current Opinion in Virology*, 3(5), 487–94. doi:10.1016/j.coviro.2013.08.007
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2014). Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 12–9. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.026
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2014). Rekindled HIV infection. *Science*, 345(6200), 1005–1006. doi:10.1126/science.1259452
- Siliciano, R. F., & Greene, W. C. (2011). HIV latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a007096. doi:10.1101/cshperspect.a007096
- Søgaard, O. S., Graversen, M. E., Leth, S., Brinkmann, C. R., Kjær, A.-S., Olesen, R., & Tolstrup, M. (2014). The HDAC inhibitor romidepsin is safe and effectively reverses HIV-1 latency in vivo as measured by standard clinical assays. In *20th International AIDS Conference, 20-25 July, 2014*. Melbourne, Australia. doi:TUAA0106LB
- Stevenson, M. (2013). CROI 2013: Basic Science Review. *Topics in Antiviral Medicine*, 21(2), 42–46.

Tan, J., & Sattentau, Q. J. (2013). The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche? *Trends in Microbiology*, 21(8), 405–12. doi:10.1016/j.tim.2013.05.001

Taveira, N. (2013). Laboratory research targets in HIV. In *Progressos na direção da cura no VIH e hepatites : compreendendo um quadro de mudança* (p. 12). Lisboa.

Taveira, N., Borrego, P., & Bárto, I. (2011). Biologia molecular de VIH. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª Edição., pp. 31–52). Lisboa: Permanyer Portugal.

Taveira, N., & Ferreira, M. O. (2011). Diversidade Genética do VIH. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª Edição., pp. 3–12). Lisboa: Permanyer Portugal.

Teófilo, E. (2013a). Bridging the gap: novel strategies and evolving standard of care in HIV. In *Progressos na direção da cura no VIH e hepatites : compreendendo um quadro de mudança* (p. 10). Lisboa.

Teófilo, E. (2013b). What we talk about when we talk about cure: treatment paradigms in virology. In *Progressos na direção da cura no VIH e hepatites : compreendendo um quadro de mudança* (pp. 6–8).

Trono, D., Van Lint, C., Rouzioux, C., Verdin, E., Barré-Sinoussi, F., Chun, T.-W., & Chomont, N. (2010). HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5988), 174–80. doi:10.1126/science.1191047

UNAIDS. (2013). AIDS by the numbers. *UNAIDS Corporate Publications*, 1–12. Retrieved from http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2013/JC2571_AIDS_by_the_numbers_en.pdf

UNAIDS. (2014). *Global statistics - fact sheet*. Retrieved from http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716_FactSheet_en.pdf

Valadas, E. (2011). Espectro Clínico da infecção por VIH. In F. Antunes (Ed.), *Manual sobre a Sida* (4ª Edição., pp. 131–138). Permanyer Portugal.

Valadas, E. (2013). Cure since CROI: recent experience and remaining questions. In *Progressos na direção da cura no VIH e hepatites : compreendendo um quadro de mudança* (p. 9). Lisboa.

Van Lint, C., Bouchat, S., & Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology*, 10(1), 67. doi:10.1186/1742-4690-10-67

Wei, D. G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., & Cihlar, T. (2014). Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004071. doi:10.1371/journal.ppat.1004071

WHO. (n.d.-a). *HIV Vaccine development. Immunization, Vaccines and Biologicals*. Retrieved August 28, 2014, from http://www.who.int/immunization/research/development/hiv_vaccdev/en/

WHO. (n.d.-b). *Number of people (all ages) living with HIV Data by country. Global Health Observatory Data Repository*. Retrieved August 26, 1BC, from <http://apps.who.int/gho/data/?theme=main&vid=22100>

WHO. (2013). *CONSOLIDATED GUIDELINES on the use of ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTION Recommendations for a public health approach* (pp. 92–154). Geneva. doi:978 92 4 150572 7

WHO. (2014a). *Core epidemiological slides HIV/AIDS estimates. HIV/AIDS- Data and Statistics*. Retrieved August 25, 2014, from <http://www.who.int/hiv/data/en/>

WHO. (2014b). *Global update on the health sector response to HIV, 2014 Executive summary* (pp. 4–6). Geneva. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128494/1/9789241507585_eng.pdf?ua=1

WHO. (2014c). *HIV/AIDS. Media Centre*. Retrieved August 25, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>

WHO. (2014d). *HIV/AIDS. Immunization, Vaccines end Biologicals*. Retrieved August 25, 2014, from <http://www.who.int/immunization/diseases/hiv/en/>

WHO. (2014e). *Use of antiretrovirals for treatment and prevention of HIV infection. HIV/AIDS - Topics*. Retrieved September 07, 1BC, from <http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/>

WHO regional office for Europe. (2014). *HIV/AIDS epidemic in Europe: HIV treatment and care. Health topics -News*. Retrieved August 28, 2014, from <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hivaids/news/news/2014/08/hivaids-epidemic-in-europe-hiv-treatment-and-care>

WHO, UNICEF, & UNAIDS. (2013). *GLOBAL UPDAGLOBAL UPDATE ON HIV TREATMENT 2013: RESULTS, IMPACT AND OPPORTUNITIES* (pp. 90–100). Geneva. doi:978 92 4 150573 4